



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Desarrollo de nuevas herramientas y protocolos
de selección de proteínas termoestables en
*Thermus thermophilus***



TESIS DOCTORAL
Emilio Blas Galindo
Madrid 2007

Memoria presentada por Emilio Blas Galindo para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección del Dr. José Berenguer Carlos, en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid 2007.

ÍNDICE**ABSTRACT**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El género <i>Thermus</i>	1
1.1.1 Descripción	1
1.1.2 Transformabilidad	2
1.2 Enzimas termoestables	3
1.2.1 Fuentes de enzimas termoestables	4
1.2.2 Producción de enzimas termoestables	4
1.2.3 Termoestabilización de enzimas termófilas	5
1.2.4 Microorganismos termófilos como factorías celulares	7
1.3 Herramientas genéticas disponibles para <i>Thermus</i> spp.	8
1.3.1 Selección por resistencia termoestable a antibióticos	8
1.3.2 Selección por complementación de auxotrofías	9
1.3.3 Genes testigo de actividad termoestable	9
1.3.4 Plásmidos	9
1.3.5 Generación de mutantes	10
1.3.6 Nuevas herramientas	11
1.4 El ribosoma bacteriano	11
1.4.1 Inhibidores de la síntesis de proteínas útiles como antibióticos	15
1.4.2 Proteína S12	18
1.5 GFP como herramienta de localización y selección	21
1.6 Interferón Gamma humano	23

2. OBJETIVOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Material biológico	27
3.1.1 Cepas utilizadas	27
3.1.2 Plásmidos utilizados	28
3.1.3 Plásmidos contruidos en este trabajo	30
3.1.4 Anticuerpos usados en este trabajo	32
3.2 Material químico y biológico	32
3.2.1 Tampones y otras soluciones	32
3.2.2 Oligonucleótidos utilizados	33
3.3 Métodos microbiológicos	35
3.3.1 Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas	35
3.3.2 Transformación bacteriana	36
3.3.3 Crecimiento de <i>T. thermophilus</i> en distintas condiciones	37
3.3.4 Fraccionamiento celular	37
3.4 Manipulación de DNA	37
3.4.1 Preparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	37
3.4.2 Preparación de DNA cromosómico de <i>T. thermophilus</i>	38
3.4.3 Precipitación de DNA	38
3.4.4 Clonaje y amplificación de DNA	38
3.4.5 Secuenciación de DNA	39
3.4.6 Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA	40
3.4.7 Generación de librería de Interferón Gamma humano	40
3.5 Manipulación de proteínas	41
3.5.1 Preparación de extractos para electroforesis	41
3.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	41
3.5.3 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)	42
3.5.4 Medida de actividades enzimáticas <i>in vitro</i>	42
-Ensayo de actividad β -galactosidasa	42
-Ensayo de actividad nitrato reductasa	42
-Ensayo de actividad fosfatasa alcalina	43

3.5.5 Pulso proteolítico	43
3.5.6 Producción de Interferón en células COS7	43
3.5.7 Factor de Termoestabilidad (TF)	44
3.6 Observación microscópica	44
3.6.1 Microscopía confocal	44
3.7 Comparación de secuencias y predicción de estructuras mediante herramientas informáticas	45
4. RESULTADOS	47
<u>Capítulo 1: Desarrollo de vectores</u>	47
4.1.1 Construcción de un plásmido con marcador de resistencia termoestable a higromicina	47
4.1.1.1 Construcción de pMK184	47
4.1.1.2 Construcción de pMH184	48
4.1.1.3 Estabilidad y eficiencia de transformación de pMH184	48
-Termo-resistencia	48
-Nivel de resistencia frente a higromicina	49
-Eficiencia de transformación	50
4.1.1.4 Expresión del gen <i>bgaA</i> desde pMH184	51
4.1.2 Construcción de un vector para prueba de promotores	51
4.1.2.1 Construcción de pMHbglu	51
4.1.2.2 Ensayo de actividad β -glucosidasa	52
<u>Capítulo 2: Desarrollo de un nuevo marcador de selección termoestable para <i>Thermus</i></u>	53
4.2.1 Búsqueda de nuevos marcadores de selección	53
4.2.2 Aislamiento de mutantes resistentes a estreptomicina	53
4.2.3 Aislamiento de las mutaciones simples del alelo <i>rpsL1</i>	55
4.2.4 <i>rpsL1</i> confiere dependencia de estreptomicina	56
4.2.5 Base estructural del fenotipo de dependencia de estreptomicina	58
4.2.6 Utilización de <i>rpsL1</i> en vectores	59

4.2.7 Construcción de vectores integrativos basados en <i>rpsL1</i>	60
4.2.8 Construcción de un vector replicativo basado en <i>rpsL1</i>	64
4.2.9 Dependencia de estreptomicina conferida por pS18 y pMS18	65
4.2.10 Crecimiento de mutantes dependientes de estreptomicina	66
4.2.11 Utilización de pS18a para la delección forzada de genes en <i>T. thermophilus</i>	67
4.2.12 Inserción en el cromosoma de una β -galactosidasa termoestable en un fondo genético silvestre	69
4.2.13 Inserción en el cromosoma del gen <i>phoA</i> en un fondo genético <i>phoA::kat</i> resistente a kanamicina	70
4.2.14 Inserción en el cromosoma del gen <i>narC</i> en un fondo genético <i>narC::kat</i> resistente a kanamicina	70
4.2.15 Inserción en el cromosoma del gen <i>gfh1</i> en un fondo genético $\Delta gfh1::kat$ resistente a kanamicina	71
 Capítulo 3: Desarrollo de un marcador de localización termoestable en <i>Thermus thermophilus</i>	 73
4.3.1 Construcción de vectores	73
4.3.2 sGFP es activa <i>in vivo</i> a altas temperaturas	74
4.3.3 sGFP es activa a alta temperatura	74
4.3.4 Construcción y expresión de fusiones proteína-sGFP	75
4.3.5 Localización <i>in vivo</i> de proteínas fusión con sGFP	77
4.3.6 Expresión de PhoA-sGFP en mutantes de <i>T. thermophilus csaB</i>	77
 Capítulo 4: Diseño de un nuevo sistema de selección en <i>Thermus thermophilus</i> de proteínas mutantes termoestables	 79
4.4.1 Modelo de termoestabilización de proteínas	79
4.4.2 Construcción de vector para termoestabilización	80
4.4.3 Condiciones óptimas de selección de mutantes termoestables	81
4.4.4 Obtención de mutantes termoestables de Interferón Gamma humano	83
4.4.5 Factor de Termoestabilidad (TF) de los mutantes de Interferón Gamma humano	84
4.4.6 Resistencia de mutantes termoestables de IFN- γ a agentes caotrópicos	87
4.4.7 Localización de mutaciones en la estructura del Interferón Gamma	87

5. DISCUSIÓN	89
Nuevos marcadores de selección	89
-Higromicina	89
-Estreptomicina	91
Localización de estructuras mediante sGFP	94
Selección de mutantes termoestables	96
6. CONCLUSIONES	100
7. BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXO	

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**Tablas**

Tabla 1. Ejemplos de microorganismos termófilos como factorías celulares	8
Tabla 2. Ejemplo de fusiones proteín-GFP	22
Tabla 3. Cepas utilizadas en este trabajo	27
Tabla 4. Plásmidos utilizados	28
Tabla 5. Plásmidos construidos en este trabajo	30
Tabla 6. Antisueros utilizados	32
Tabla 7. Tampones y otras soluciones	32
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados	33
Tabla 9: Actividad β -galactosidasa	51
Tabla 10. Tiempo de generación de las estirpes portadoras de rpsL1 y derivados	67
Tabla 11. Actividad enzimática	76
Tabla 12. Factor de Termoestabilidad	84
Tabla 13. Factor de Termoestabilidad de mutantes simples	85

Figuras de Introducción

Figura 1. Estructura del ribosoma por Crio-Microscopía Electrónica de <i>E. coli</i>	12
Figura 2. Modelo simplificado de elongación de la traducción	14
Figura 3. Subunidad 30S del ribosoma de <i>T. thermophilus</i>	15
Figura 4. Estructura de la estreptomicina	16
Figura 5. Hélice H44 del rRNA 16S	17
Figura 6. Subunidad 30S de <i>E. coli</i>	19
Figura 7. Interacción de la estreptomicina con la subunidad 30S	20
Figura 8. Estructura 3D de variantes de GFP	23
Figura 9. Estructura 3D del Interferón (IFN- γ) humano	25

Figuras de Materiales y Métodos

Figura 10. Cálculo del Factor de termoestabilidad (TF)	44
--	----

Figuras de Resultados

Figura 11. Construcción del plásmido pMK184	47
Figura 12. Construcción del plásmido pMH184	48
Figura 13. Termoresistencia	49
Figura 14. Nivel de resistencia a higromicina	50
Figura 15. Eficiencia de transformación pMK/pMH	50
Figura 16. Construcción de pMH184 β glu y derivados	52
Figura 17. Actividad β -glucosidasa	52
Figura 18. Secuencia del gen seleccionado	54
Figura 19. Esquema de la separación de las mutaciones del gen <i>rpsL 1</i>	55
Figura 20. Eficiencia de crecimiento en estreptomicina conferida por transformación con las mutaciones de <i>rpsL 1</i>	56
Figura 21. Dependencia de estreptomicina de la cepa <i>rpsL 1</i>	57
Figura 22. Dependencia a estreptomicina de <i>rpsL 1</i> y sus mutantes simples	58
Figura 23. Comparación de las estructuras del rRNA 16S y S12	59
Figura 24. Construcción de pMK184rpsL1	60
Figura 25. Construcción de pS18a y pS18b	61
Figura 26. Número de bacterias viables	62

Figura 27. Inserción de pS18a en el cromosoma	63
Figura 28. Construcción de pMS18	64
Figura 29. Viabilidad frente a estreptomicina de células transformadas con pS18a y pMS18	66
Figura 30. Utilización de <i>rpsL 1</i> para la delección forzada de genes	68
Figura 31. Construcción de plásmidos seleccionables por estreptomicina para ensayos de complementación	72
Figura 32. Ensayos de complementación	72
Figura 33. Plásmido para la expresión de las proteínas de fusión con sGFP	73
Figura 34. Expresión de sGFP a alta temperatura	75
Figura 35. Construcción y detección de fusiones con sGFP	76
Figura 36. Localización de las proteínas de fusión con sGFP	77
Figura 37. Expresión de PhoA-sGFP	78
Figura 38. Esquema del modelo de termoestabilización de proteínas	79
Figura 39. Construcción de pNCK	80
Figura 40. Funcionalidad del sistema de selección	82
Figura 41. Comparación del Factor de Termoestabilidad	86
Figura 42. Pulso proteolítico	87
Figura 43. Estructura de mutantes termoestables de IFN- γ	88

Figuras de Discusión

Figura 44. Actividad residual de mutantes de IFN- γ	97
Figura 45. Secuencia de aminoácidos del IFN- γ humano	99

,.: Separación de unidades de millar
.: Separación entre unidades y decimales
 μF : Microfaradios
 $\mu\text{g/ml}$: Microgramos por mililitro
 μg : Microgramos
 μl : Microlitro
 μm : Micrometro
 μM : Micromolar
 μmol : Micromol
 ΔG : Incremento de la energía libre
 Ω : Ohmios
3D: 3 dimensiones
aa: Aminoácidos
 Amp^r : Resistente a ampicilina
C: Citosina
cm: Centímetros
cols.: Colaboradores
 D.O._{550} : Densidad óptica a una longitud de onda de 550 nanómetros
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA: Ácido etilen diamino tetra-acético
Fig.: Figura
FOA: Ácido fluororótico
g/l: Gramos por litro
G: Guanina
GDP: Guanosin difosfato
GFP: Proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)
GTP: Guanosin trifosfato
h: Horas
 Hig^r : Resistente a higromicina
IFN: Interferón
IPTG: Isopropil-tio- β -D-galactósido
 Kan^r : Resistente a kanamicina
kat: gen codificante de la kanamicin adenil transferasa termoestable
kb/s: Kilobases por segundo
 kcal mol^{-1} : Kilocalorías por mol
kDa: Kildalton
LB: Medio de cultivo Luria-bertani
M: Molar
 mA/cm^2 : Miliamperios por centímetro cuadrado
 mg/ml : Miligramos por mililitro
min: Minutos
ml: Mililitro
mM: Milimolar

mRNA: RNA mensajero
ms: Milisegundos
ng: Nanogramo
ONPG: Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
p/v: Relación peso/volumen
pb: Pares de bases
pmol: Picomol
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
RNA: Ácido ribonucleico
RNasa A: Rinonucleasa A
rpm: Revoluciones por minutos
rRNA: RNA ribosómico
SDS: Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Str^r: Resistente a estreptomicina
t : Tiempo
TB: Medio de cultivo rico para *Thermus*
TF: Factor de Termoestabilidad
Tris: Tri-(hidroximetil)-aminometano
tRNA: RNA transferente
U: Unidad enzimática
U.M.: Unidades Miller
u.D.O.₅₅₀: Unidades de densidad óptica
V/cm: Voltios por centímetro
V: Voltios
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ABSTRACT

The genus *Thermus* has become one of the most used models for bacterial thermophiles because of its easy handling in the laboratory, its high cultures yields under aerobic conditions, and its natural competence. These properties, and the ability of its thermophilic enzymes and supramolecular complexes to crystallize at room temperatures, are on the basis of the most relevant accomplishment in recent years in the structural biology field, with paradigmatic examples as relevant as the high resolution structures of 70S ribosome, the bacterial RNA polymerase and the respiratory complex I.

To establish a clear link between structure and function a well developed resource of genetic tools are required, and this Thesis includes some of the most recent attempts to provide new tools for the genetic analysis of *Thermus*. At the time when this work started, a single antibiotic resistance (to kanamycin) could be used as selectable marker at high temperatures, and any further manipulation of the strains would require the deletion of the marker in order to be used again on the same strain. To overcome this, we attempted to use alternative gene selection markers.

For this, we followed two strategies. On one hand, we took advantage of the development in 2005 by a Japanese group (Nakamura, 2005) of a thermostable form of a hygromycin B phosphotransferase to develop new plasmids which are compatible with the resistance to kanamycin, thus allowing protein expression and complementation assays in kanamycin resistant background. The new hygromycin resistant plasmids are described in the first chapter of the Thesis.

On the other hand, in the second chapter we describe the development of a new marker based on a spontaneous allele of the *rpsL* gene coding for a mutant S12 protein that provides not only resistance but dependence from Streptomycin. Thus, such marker, allowed its use not just for positive selection to develop new plasmids, but also to carry out directed deletions of genes by using it for negative selection. We illustrate the use of this new marker by the expression of genes in *T. thermophilus*, by the complementation of mutants in kanamycin-resistant backgrounds, and through the isolation of a deletion mutant in a straight-forward strategy.

The third chapter is devoted to describe the use of a mutant form of the Green Fluorescent Protein of *Aequorea victoria* as a localization marker in *T. thermophilus*. We demonstrate that a mutant form of this protein called superfolder GFP can be expressed and processed in *T. thermophilus* at 70° C to render a fully fluorescent protein which utility is demonstrated by expressing it as C-terminal fusions to a cytoplasmic and a periplasmic protein. Noteworthy, we demonstrate that this sGFP can be secreted to the periplasm at 70° C in a fully active and folded protein.

In the last chapter of the Thesis we developed a new and general method for the stabilization of proteins through a protocol of selection in *Thermus thermophilus*, in collaboration with a biotechnology company specialized in protein evolution. The method is based on the interference that an unstable N-terminal part of a protein has on the folding of its C-terminal domain, in such a way that we developed plasmids from which protein fusions between a target and a reporter coding for a thermostable resistance marker could be expressed in *T. thermophilus* at thermophilic temperatures. By this strategy we could demonstrate this principle and select thermostable forms of the human gamma interferon, a protein that doesn't have any enzymatic activity, in a very rapid and efficient protocol. The general application of this method to other proteins and enzymes could also be demonstrated further in the biotech company.

INTRODUCCIÓN

1.1 EL GÉNERO *Thermus*

1.1.1 Descripción

El género *Thermus* spp, descrito por Brock y Freeze (1969) incluye aislados de bacterias termófilas moderadas y extremas, generalmente aerobias, pigmentadas, de tinción Gram negativa y con un contenido en G+C entorno al 70 %. La secuencia de su rRNA 16S, así como la de muchas proteínas habitualmente empleadas como relojes moleculares, permite definir al género como perteneciente a una de las ramas más antiguas de la filogenia bacteriana, formando junto con los cocos Gram positivos del género *Deinococcus* uno de los Filum en los que se dividen actualmente las bacterias (da Costa y cols., 2001). Tras *Thermotoga* y *Aquifex*, este grupo constituiría una de las ramas más antiguas en la evolución de las bacterias (Woese, 1987), aunque existen interpretaciones alternativas basadas tanto en el análisis de la ultraestructura de las envolturas celulares como en la presencia de inserciones y deleciones distintivas que proponen a este género como un intermedio evolutivo entre bacterias Gram positivas (“monodermas”) y Gram negativas (“didermas”) (Gupta, 2000). No obstante, la primera interpretación continúa siendo la más aceptada. Su envoltura celular presenta una estructura intermedia entre Gram positivos y Gram negativos, con una pared de peptidoglicano fina, pero con entrecruzamientos de diglicina, presencia de fenil acético y polisacáridos unidos covalentemente (SCWP, “secondary cell wall polymers”). Rodeando a la pared aparece una especie de membrana externa estructurada sobre una capa proteica cristalina (capa S) que se une a la SCWP, por lo que estos organismos realmente poseen un espacio periplásmico definido físicamente (Castán y cols., 2002).

El género es de una enorme amplitud y gran diversidad interna como consecuencia de su adaptación a diversos nichos ecológicos termófilos, incluyendo además de fuentes termales neutras o ligeramente básicas, de diferentes puntos del mundo, como Japón, Islandia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, etc. (Hudson y cols., 1989), sistemas de refrigeración de industrias y centrales nucleares (da Costa y cols., 2001). Este hecho confiere al género un enorme potencial como fuente de enzimas de posible aplicación biotecnológica y hace aconsejable el desarrollo de sistemas modelo basados en este género (Pantazaki y cols., 2002; Lioliou y cols., 2004).

A nivel metabólico, se trata de uno de los pocos termófilos aerobios o al menos facultativos. Emplea aminoácidos y azúcares como fuentes de carbono y energía preferidos, aunque la mayor parte de las estirpes pueden crecer en medios minerales con amonio y algún azúcar, lo que indica la existencia de un metabolismo biosintético bastante completo. Este carácter aerobio y la no existencia de requerimientos

especiales hacen que su crecimiento sea bastante rápido y fácil de reproducir en condiciones de laboratorio, lográndose con algunas cepas tiempos de duplicación de 40 minutos.

La secuenciación del genoma de tres cepas de *Thermus* ha sido completada y dada en acceso libre recientemente (dos completas y una sin ensamblar). Es relevante destacar en este punto que el genoma de este organismo codifica unos 2200 genes, prácticamente la mitad que muchas cepas de *Escherichia coli*, lo que confirma la tendencia a la reducción de la información genética con la temperatura de crecimiento. Además, la cepa *Thermus thermophilus* HB8 ha sido elegida para el desarrollo de un programa de biología estructural que para finales del año 2006 había dado lugar a la cristalización de 632 proteínas y a las estructuras 3D de 300 de ellas.

1.1.2 Transformabilidad

Una de las características más relevantes del género a nivel de su empleo como modelo es la posesión de un sistema de competencia natural formado por al menos 16 proteínas codificadas en 7 loci diferentes, que se expresa constitutivamente y que es de una enorme eficiencia, permitiendo velocidades de entrada de DNA lineal o circular muy elevada (40 kb/s y célula en algunas cepas) (Schwarzenlander y Averhoff, 2006). En algunos casos se ha podido demostrar también la capacidad de determinadas cepas de transferir copias completas de su genoma a una cepa receptora mediante mecanismos conjugativos similares a los descritos para las cepas Hfr de *E. coli*, y que probablemente implique, como en éstas, la inserción de un plásmido conjugativo en algún punto del cromosoma de la cepa donadora (Ramírez-Arcos y cols., 1998).

A nivel de potenciales vectores para el desarrollo de sistemas de transferencia genética, muchas de las cepas de *Thermus spp* aisladas contienen plásmidos crípticos de distintos tamaños y, en general, bajo número de copias (Vasquez y cols., 1984), alguno de los cuales ha sido empleado para la construcción de vectores de clonaje y expresión. También han sido descritos virus de diversas familias capaces de infectar de forma más o menos específica a distintas cepas de *Thermus spp*. Así, recientemente se han descrito de manera simultánea nada menos que 113 virus nuevos específicos del género y pertenecientes a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Tectiviridae* e *Inoviridae* (Yu y cols., 2006), aunque no existen aún descripciones que indiquen nada acerca de su posible utilización para el desarrollo de vectores. No obstante, resulta obvio el potencial biotecnológico de los genes codificados por tales virus.

1.2 ENZIMAS TERMOESTABLES

Además de la resistencia y capacidad de funcionamiento a elevadas temperaturas, las enzimas procedentes de microorganismos termófilos o termozimas presentan también mayor resistencia que sus homólogas procedentes de mesófilos frente a agentes desnaturalizantes como cosolventes, agentes caotrópicos y detergentes, no requieren refrigeración para su mantenimiento en forma activa y presentan vidas medias prolongadas (Coolbear y cols., 1992; Adams y cols., 1998; Bruins y cols., 2001). Por estas razones, la termoestabilidad es un carácter muy deseable para muchas de las aplicaciones industriales de los biocatalizadores. Las diferencias entre termozimas y mesozimas homólogas que justifican este incremento general en la resistencia no son fácilmente deducibles de la comparación de secuencias, que básicamente revela la disminución en la frecuencia de aparición de ciertos aminoácidos sensibles a la oxidación a elevadas temperaturas (glutamina, asparagina, cisteína) y un incremento en los porcentajes de aparición de aminoácidos que favorecen la formación de hélices alfa o el establecimiento de interacciones iónicas (Bruins y cols., 2001; Vieille y Zeikus, 2001). No obstante, estas diferencias son detectables a nivel estadístico cuando se comparan gran número de secuencias, pero no constituyen una regla infalible en todos los casos. Por el contrario, el enorme incremento en el número de estructuras tridimensionales disponibles que se ha producido en los últimos años ha permitido comprobar cómo las termozimas presentan una estructura más compacta, que normalmente no implica un menor volumen, sino el rellenado de espacios internos observables en sus mesozimas homólogas mediante la aparición de aminoácidos más voluminosos, el incremento de rigidez de lazos flexibles, el frecuente acortamiento de extremos amino y/o carboxilo, el reforzamiento de las estructuras secundarias, especialmente alfa-hélices y el establecimiento de un mayor número de interacciones o redes iónicas en la superficie (Vieille y Zeikus, 2001).

Todos estos cambios se traducen en último extremo en una mayor rigidez de las termozimas a temperaturas moderadas en prácticamente todas su estructura, incluyendo el centro activo, lo que tiene como consecuencia la falta de actividad a temperaturas moderadas (Fields, 2001). De este modo, los perfiles de temperaturas óptimas de funcionamiento de las termozimas son un calco de los de las mesozimas, pero desplazados 30 o 40° C. Esta propiedad constituye algo no siempre deseable en las aplicaciones industriales en las que la estabilidad de sustratos o productos no sea muy elevada, lo que ha llevado a la industria a tratar de desarrollar mediante “evolución dirigida” o por modificación química, enzimas con la resistencia de las

termozimas, pero con capacidad de funcionamiento en rangos de temperaturas más amplios.

1.2.1 Fuentes de enzimas termoestables

Aunque la presencia y concentración de metabolitos protectores (poliaminas, azúcares, fosfogliceratos de azúcares) específicos ayuda a proteger parcialmente (unos 5° C) las enzimas en el interior del citoplasma de muchos de los microorganismos más termófilos (Santos y da Costa, 2001), éstas presentan óptimos de actividad próximos a los de crecimiento del organismo de procedencia (Coolbear y cols., 2001). Puesto que estos varían en un rango tan amplio que obliga a dividir el término general de termófilo en moderados (50-60° C), extremos (60-80° C) e hipertermófilos (>80° C), lo esperable es que las enzimas de cada uno de estos grupos presenten sus respectivos óptimos dentro de estos rangos.

A nivel evolutivo, el carácter termófilo moderado es relativamente frecuente, apareciendo en multitud de bacterias, en arqueas y en un número reducido de eucariotas. Por el contrario, la inmensa mayoría de termófilos extremos e hipertermófilos pertenecen a ramas cortas del árbol filogenético universal, lo que constituye el indicio más aceptado del carácter ancestral de la termofilia. En todo caso y en relación con la posible búsqueda de nuevas termozimas, es muy importante tener en cuenta tres factores que afectan al espectro de enzimas esperables en los lugares de búsqueda: por un lado la biodiversidad disminuye con la temperatura, por lo que el número de microorganismos sobre los que se puede efectuar tal búsqueda es inversamente proporcional a la temperatura del medio; por otro lado, a medida que aumenta la temperatura de crecimiento, también lo hacen las propias dificultades técnicas para el aislamiento de tales microorganismos; finalmente, los estudios genómicos han revelado que el contenido genético disminuye también con la temperatura, por lo que no es esperable la existencia de sistemas enzimáticos redundantes ni isoenzimas diversas en un mismo organismo. En definitiva, cualquier programa de búsqueda de nuevas termozimas, incluidos los basados en metagenómica, deben tener en cuenta estos aspectos a la hora de elegir bien los nichos de aislamiento.

1.2.2 Producción de enzimas termoestables

La producción de termozimas se efectúa generalmente en un microorganismo modelo al que se le transfiere el gen codificante en un plásmido o vector bajo el control de algún promotor inducible. Como sistemas modelo se emplean desde bacterias (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* especialmente) a eucariotas (*Saccharomyces*

cerevisiae, *Pichia pastoris*). No obstante, este procedimiento tan conveniente y rentable sólo funciona bien para un número reducido de termozimas, generalmente correspondientes a enzimas solubles, sencillas (monómeros u homo-oligómeros), que no requieren de procesamiento específico ni de incorporación de cofactores. De los programas actualmente existentes de genómica estructural de organismos termófilos (*Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*), en los que se pretende clonar, producir y cristalizar todas las proteínas codificadas en sus genomas, los datos indican que solamente alrededor del 30-40 % son producibles en forma activa en *E. coli*, lo que sugiere que, además de las causas comentadas anteriormente, existe una dificultad intrínseca al hecho de tratar de producir enzimas entre 30 y 40° C por debajo de su temperatura natural de expresión. Este hecho limita aún más el espectro de enzimas codificadas por microorganismos termófilos.

1.2.3 Termoestabilización de proteínas mesófilas

La aplicación potencial de las proteínas termoestables para la industria hace que se trate de buscar enzimas “a medida” tanto en estabilidad como en otros aspectos de interés para su aplicación, lo que ha llevado a la obtención de enzimas modificadas a partir de organismos mesófilos, principalmente por dos métodos:

Mutagénesis dirigida: El hecho de que la termoestabilidad de enzimas procedentes de microorganismos termófilos dependa de los mismos elementos que estabilizan las proteínas mesófilas, implica que debería ser relativamente sencillo termoestabilizar proteínas procedentes de mesófilos mediante la introducción por ingeniería genética de nuevos enlaces o mediante la intensificación de los ya existentes. Las estrategias usadas se apoyan en un diseño teórico de los cambios a introducir en la estructura 3D de la proteína basándose en comparaciones con proteínas termófilas homólogas. Sin embargo, esta estrategia está limitada muchas veces por la ausencia de estructuras 3D de la proteína a modificar y la necesidad de predecirla a partir de secuencias de aminoácidos. En estos casos la introducción de modificaciones presenta una elevada tasa de fracaso (Veltman y cols., 1997).

Evolución molecular: Consiste en introducir mediante mutagénesis al azar cambios en el gen que codifica la enzima que se desea termoestabilizar. Posteriormente se seleccionan aquellos clones que siguen reteniendo la actividad enzimática en las condiciones de funcionamiento deseadas. Este proceso de selección

se puede realizar en *E. coli* u otro organismo mesófilo mediante el empleo a gran escala de robots y la búsqueda de una propiedad determinada. Alternativamente, se puede proceder a una selección funcional en un organismo termófilo “manipulable genéticamente” mediante el crecimiento de dicho organismo en condiciones tales que la actividad enzimática sea requerida para el crecimiento. A diferencia de la mutagénesis dirigida, en este sistema no se predicen los cambios que van a tener lugar, sino que se selecciona sobre una enorme base de mutaciones. Estos procesos de selección son graduales en muchas ocasiones, pues lo que se pretende seleccionar se aleja mucho en cuanto a condiciones de las características del enzima de partida, necesitándose varias mutaciones para la adaptación de la enzima. Por ello se suele proceder a varios procesos de selección sucesivos, modificando las condiciones de ensayo-selección de la actividad de forma progresiva (Tamakoshi y cols., 2001). En el caso de la selección funcional en termófilos, el primer ejemplo de funcionamiento de tal sistema fue la estabilización del gen de la kanamicin-nucleotidil-transferasa (Matsumura y Aiba, 1985). Con posterioridad varias enzimas han sido estabilizadas por este método, como la Bleomicina (Brouns y cols., 2005), Hygromycina B fosfotransferasa para *T. thermophilus* (Nakamura y cols., 2005) y *Sulfolobus solfataricus* (Cannio y cols., 2001), una β -galactosidasa de *Bacillus stearothermophilus* (Fridjonsson y cols., 2002) y la 3-isopropilmalato deshidrogenasa de *E. coli* (Tamakoshi y cols., 1995) y de *Saccharomyces cerevisiae* (Tamakoshi y cols., 2001). La descripción posterior de la estructura tridimensional detallada de las enzimas mutantes termoestabilizadas ha proporcionado una información interesante sobre la relación entre estructura y estabilidad (Spiller y cols., 1999, Wintrode y cols., 2003) aunque con la excepción de las enzimas que confieren resistencia a los antibióticos, la principal dificultad de estos métodos de selección radica en la necesidad de aislar cepas que dependan de la actividad a seleccionar mediante técnicas genéticas disponibles únicamente por unos cuantos laboratorios a nivel mundial.

Además de estas técnicas dependientes de actividad enzimática, hay otras independientes de actividad disponibles. La técnica Proside (“protein stability increased by directed evolution”) (Sieber y cols., 1998) para la estabilización de proteínas vincula la resistencia a proteasas de las variantes estables de una proteína con la infectividad de un fago filamentoso, pero este método tiene limitaciones severas respecto al tamaño de la proteína a seleccionar (<110 aminoácidos); otros sistemas, como “yeast display” (Richman y cols., 2006) pueden aplicarse para la selección de mutantes termoestables de proteínas de gran tamaño, pero requieren herramientas para la selección con FACS (“Fluorescence-activated cell sorting”) (p. ej. anticuerpos),

que son caros y no siempre están disponibles para la proteína de interés; un ejemplo más es el método de fusión de una proteína de interés con GFP (“Green Fluorescent Protein”) (Waldo y cols., 1999). Mediante este método se relaciona el correcto plegamiento de la proteína de interés con el plegamiento de GFP, que podrá ser detectada gracias a la fluorescencia emitida. Partiendo de este método de selección, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue el desarrollo de un método alternativo de selección de proteínas termoestables en *T. thermophilus*.

1.2.4 Microorganismos termófilos como factorías celulares

La alternativa obvia a las dificultades de expresión comentadas anteriormente sería la producción de las enzimas en el propio organismo de procedencia, tras la conveniente manipulación de éste para incrementar su rendimiento. Sin embargo, la mayor parte de los organismos termófilos extremos e hipertermófilos son de difícil crecimiento en condiciones de laboratorio, pues en su mayoría son anaerobios y muchos presentan metabolismo quimiolitotrófico de bajo rendimiento. Adicionalmente, no existen sistemas que permitan la manipulación genética de prácticamente ninguno de ellos. Por tal motivo se están tratando de desarrollar metodologías de manipulación genética de bacterias y arqueas termófilas extremas para que puedan ser empleadas como factorías celulares en la producción de termozimas. En la tabla 1 se presenta un resumen de las principales propiedades en relación con su posible manipulación genética de microorganismos extremos e hipertermófilos que han sido estudiados o propuestos como posibles sistemas modelo tanto para estudios de su biología como para su empleo en la producción de termozimas.

Como se observa en la tabla 1, dentro del dominio *Archaea* los modelos más desarrollados son los correspondientes a *S. solfataricus* y *Thermococcus kodakarensis*, para los cuales han sido descritos sistemas de transformación por electroporación, así como métodos de selección positiva frente a algunos antibióticos y antimetabolitos, y de selección mediante complementación de la auxotrofia para uracilo producida por crecimiento en ácido fluororótico (FOA), que genera defectos en los genes *pyrE* y/o *pyrF*. A nivel de bacterias termófilas extremas, *T. thermophilus* es prácticamente el único microorganismo para el que se han descrito métodos de manipulación comparables a los existentes en muchas bacterias mesófilas.

	Organismo	Top	Mut.	Trans. Gen.	Plas	Virus	Res. Antib.	Comp. Aux.	Gen Test.
ARQUEA	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	87	+++	+	++	++	Hyg Adh	PyrEF	LacS
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	75	++	+	+	-	-	PyrEF	-
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	++	+	+	-	Adh	-	-
	<i>Pyrococcus abissi</i>	100	++	+	+	++	-	PyrEF	-
	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	85	++	++	+	-	Sin	PyrEF	LacS
BACTERIA	<i>Thermotoga neapolitana</i>	80	++	+/-	+/-	-	-	-	-
	<i>Thermus thermophilus</i>	75	+++	+++	+++	+++	Kan Bleo Hyg	LeuB TrpB PyrEF	BgaA PhoA

Tabla 1: Ejemplos de microorganismos termófilos como factorías celulares. Top) Temperatura óptima; Mut) Descripción de aislamiento de mutantes; Trans. Gen) transformación genética; Ps) Presencia de plásmidos; Virus) Existencia de virus descritos; Res. Antib.) Resistencia a antibiótico o antimetabolitos (Hyg, Kan, Bleo y Sin confieren resistencia a Hygromicina B, Kanamicina, Bleomicina y Sinvastatina respectivamente; Adh codifica resistencia a alcoholes); Comp. Aux.) Complementación de auxótrofos (PyrE/F complementan auxótrofos para uracilo, LeuB y TrpB para leucina y triptófano); Gen. Test.) Genes testigo (LacS y BgaA son beta-galactosidasas, PhoA es una fosfatasa alcalina). Los signos indican: -) no detectada; +/-) presencia transitoria; + a +++) abundancia y frecuencia de descripciones.

1.3 HERRAMIENTAS GENÉTICAS DISPONIBLES PARA *Thermus spp*

1.3.1 Selección por resistencia termoestable a antibióticos

Uno de los principales problemas a la hora de desarrollar sistemas modelo termófilos es la escasez de genes de selección por resistencia a antibióticos, al ser termosensibles la mayoría de los antibióticos y las enzimas necesarias para su inactivación. El primer sistema de selección termorresistente por antibiótico fue el correspondiente a una kanamicin nucleotidil transferasa mutante que fue seleccionada por resistencia térmica en *Geobacillus stearothermophilus* y que presentaba un par de mutaciones (N80Y, T130L) con respecto a la habitualmente presente en microorganismos mesófilos (Liao y cols., 1986). Este gen fue puesto bajo control de un promotor de *T. thermophilus* y empleado como primer sistema de resistencia en este organismo en 1992 (Lasa y cols., 1992; Mather y Fee, 1992), siendo desde entonces único hasta que en 2005 se publicó la selección por evolución dirigida en *T. thermophilus* de otras dos resistencias, una a bleomicina (Brouns y cols., 2005) y otra a higromicina B (Nakamura y cols., 2005).

1.3.2 Selección por complementación de auxotrofías

Los primeros sistemas de selección positiva en *Thermus spp* datan de los años 90, en los que se empezaron a utilizar sistemas de complementación de auxotrofías, inicialmente frente a triptófano, empleando el gen *trpB*, y posteriormente para Leucina, con el gen *leuB* como sistema de selección. Uno de los problemas principales que tales sistemas de selección presentaron fue la frecuencia tan elevada con la que se producían recombinaciones genéticas con los genes homólogos defectivos presentes en el cromosoma, y que generaban un elevado nivel de fondo durante las selecciones. Más recientemente se ha procedido a la adaptación del sistema de selección por prototrofia de mutantes URA tan empleado en levaduras y que combina selecciones positivas y negativas que permiten la delección dirigida de genes. El sistema se basa en la fuerte contraselección ejercida por el ácido fluororótico sobre la orotato fosforibosil transferasa (PyrE), una enzima necesaria para sintetizar uracilo que permite la selección negativa de protótrofos. La utilización de este gen como criterio de selección en mutantes *pyrE* permite el desarrollo de sistemas de delección dirigida de genes (Tamakoshi y cols., 1999), algo realmente útil para el desarrollo de cepas “a la carta” con defectos específicos para ser empleadas en procesos de selección térmica funcional de enzimas mesófilas.

1.3.3 Genes testigo de actividad termoestable

Recientemente han sido empleados los genes *bgaA* y *phoA*, codificantes de una β -galactosidasa citoplásmica y una fosfatasa hiperalcalina periplásmica termoestables, que han mostrado ser de gran utilidad para el análisis de la expresión de genes *in vivo* (Cava y cols., 2004; Cava y cols., 2007). Ambas enzimas presentan un perfil de actividad con máximos a 85° C aproximadamente, y en el caso de PhoA, capacidad de resistencia hasta pH 13, lo que permite su utilización en un amplio rango de condiciones (Renata Moreno, Tesis Doctoral).

1.3.4 Plásmidos

Existen en la actualidad plásmidos replicativos bifuncionales *Thermus-E. coli* derivados de tres orígenes de replicación diferentes aislados a partir de fragmentos de plásmidos crípticos presentes en tres cepas de *Thermus spp*, a los que se les ha incluido un replicón de *E. coli*. Las versiones originales de todos ellos fueron seleccionables mediante resistencia termoestable a kanamicina (Lasa y cols., 1992; de Grado y cols., 1999), aunque existen ya algunos derivados con resistencia a bleomicina (Brouns y cols., 2005) o a higromicina B (Nakamura y cols., 2005) que permiten expresar proteínas en fondos genéticos ya resistentes a kanamicina.

Algunos de estos plásmidos pueden ser empleados para la expresión constitutiva de proteínas en *T. thermophilus* mediante la generación de fusiones transcripcionales con el gen de resistencia expresado desde un promotor bastante potente, pero existen además otras versiones dotadas de un promotor derivado del operón de la nitrato reductasa que puede ser inducido por nitrato y en condiciones microaerófilas (Moreno y cols., 2003).

1.3.5 Generación de mutantes

En la actualidad la obtención de mutantes de inserción dirigida del gen de resistencia kanamicina sobre cualquier gen “blanco” no esencial resulta bastante sencilla en la mayor parte de las cepas de *T. thermophilus*, existiendo muchos ejemplos de ello descritos (Lasa y cols., 1992b; Fernández-Herrero y cols., 1995; Ramírez-Arcos y cols., 1998b). Básicamente se trata de poner zonas anteriores y posteriores al gen blanco rodeando al de resistencia al antibiótico, y de transformar con la construcción lineal seleccionando después para la resistencia a kanamicina..

Un segundo método de obtención de mutantes consiste en la utilización de vectores suicidas que contienen el gen de resistencia termoestable a kanamicina, pero no replican en *Thermus spp*. El clonaje de un fragmento central del gen blanco a inactivar en estos vectores y su utilización por transformación conlleva necesariamente la integración por recombinación, seleccionada por la resistencia al antibiótico. En las cepas obtenidas lo que se obtienen son dos copias del gen mutado, una con una deleción en su extremo 3' y la otra con una deleción en 5', cuya extensión depende del fragmento empleado para la inactivación.

Cabe destacar que actualmente es posible el aislamiento de mutantes de deleción carentes de genes de resistencia, tanto en base a la utilización del gen *pyrE* en cepas auxótrofas para uracilo, y su posterior eliminación por incubación con FOA (Tamakoshi y cols., 1999), tal y como se ha comentado anteriormente, como mediante el uso de vectores suicidas (no replican en *Thermus spp*) portadores de resistencia a kanamicina. En estos, se insertan las regiones flanqueantes al gen a delecionar, de forma que se puede forzar una inserción recombinativa del plásmido (no replicativo) sobre el gen blanco por transformación y selección en el antibiótico. Puesto que la estabilidad de estos merodiploides es relativamente baja, existe una fuerte tendencia a la pérdida del plásmido por retrorecombinación que, si el sistema está bien diseñado, debe de conducir a la obtención de un 50 % de mutantes de deleción, y otro tanto de revertientes silvestres, todos ellos ya sensibles al antibiótico. Este sistema se ha empleado por ejemplo para la obtención de mutantes sencillos y dobles de los factores traduccionales GreA y Gfh1 de *T. thermophilus* (Laptenko y cols., 2006).

Finalmente, el estudio de genes de función esencial para el organismo es también abordable en base a la expresión de un RNA antisentido capaz de provocar un fuerte descenso en la expresión de su gen blanco, lo que permite estudiar la función biológica de genes esenciales (Moreno y cols., 2004).

1.3.6 Nuevas herramientas

Además del interés biológico que suscita su carácter ancestral y su adaptación a altas temperaturas, los microorganismos termófilos constituyen una fuente muy importante de termozimas. Por ello, es necesaria la disponibilidad de nuevas herramientas para profundizar en el conocimiento de dichos organismos. Uno de los factores limitantes a la hora de la manipulación genética de los microorganismos termófilos es el escaso número de resistencias a antibióticos disponibles. Otro problema añadido de la elevada temperatura de crecimiento de estos microorganismos es que hasta la actualidad no ha habido ningún sistema de localización de estructuras, que podría ser muy útil para ampliar el conocimiento de dichos microorganismos. Debido al interés actual en la producción de enzimas termoestables, sería muy interesante disponer de sistemas de termoselección de enzimas procedentes de organismos mesófilos utilizando microorganismos termófilos como hospedadores para la selección de formas termoestables de dichas enzimas. En esta Tesis Doctoral tratamos de cubrir algunas de estas carencias en cuanto a la necesidad de disponer de nuevas herramientas deseables para este tipo de trabajo. Por un lado tratamos de obtener nuevos marcadores de resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas. Por otro lado, tratamos de adaptar a *T. thermophilus* un sistema de localización de proteínas asociado a la fusión con mutantes de GFP, y por último, desarrollar un sistema universal de termoselección de enzimas procedentes de organismos mesófilos.

1.4 EL RIBOSOMA BACTERIANO

El ribosoma es el orgánulo celular encargado de la síntesis de proteínas utilizando RNA de transferencia aminoacilado (aa-tRNA) como sustrato, a partir del RNA mensajero (mRNA). En todos los organismos, el ribosoma está formado de una subunidad grande y una pequeña, que en bacterias se nombran 50S y 30S, de acuerdo a su velocidad de sedimentación. Durante la traducción ambas subunidades se unen para formar el ribosoma 70S. La estructura 3D detallada del ribosoma bacteriano es conocida desde hace unos años (Ramakrishnan, 2002), precisamente

utilizando el ribosoma de *T. thermophilus*, lo que da a entender la utilidad de este microorganismo como modelo también en Biología Estructural.

La subunidad 50S está formada por dos moléculas de rRNA (23S y 5S) y 34 proteínas (L), la subunidad pequeña tiene una molécula de rRNA 16S y 21 proteínas (S1 a S21). El ribosoma contiene tres lugares de unión para moléculas de RNA: uno para mRNA y dos para tRNA, llamados sitio A (por aceptor o aminoacil), sitio P (peptidil) y E (salida, “exit”), que están localizados en parte en ambas subunidades (Fig. 1). El lugar de unión peptidil-tRNA o lugar P acoge a la molécula de tRNA que está unida al extremo de la cadena polipeptídica en crecimiento. El lugar de unión aminoacil-tRNA o lugar A acoge a la molécula de tRNA entrante cargada con un aminoácido. La región aminoacil del tRNA se une a la subunidad 50S, donde se produce la formación del enlace de unión de un nuevo aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento. Para que una molécula de tRNA se una fuertemente a cualquiera de estos dos lugares es necesario que su anticodón forme los pares de bases adecuados con el codón complementario de la molécula de mRNA que está unida al ribosoma. Los lugares A y P están tan cerca el uno del otro que las dos moléculas de tRNA se ven forzadas a aparearse con codones adyacentes de las moléculas de mRNA (Ogle y cols., 2005; Selmer y cols., 2006; Berk y cols., 2006).

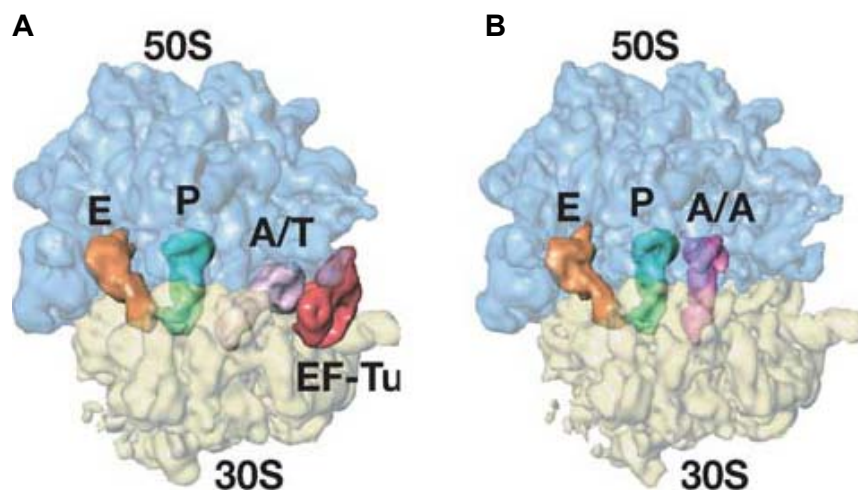


Figura 1: Estructura del ribosoma por Crio-Microscopía Electrónica de *E. coli* (Valle y cols., 2003) mostrando la incorporación de aa-tRNA en el sitio A del ribosoma. En color naranja y verde se muestran aa-tRNA en los sitios E y P respectivamente. En el sitio A se muestra el complejo ternario durante el reconocimiento del aa-tRNA (**A**) y el aa-tRNA en el sitio A una vez reconocido (**B**). El aa-tRNA que entra en el sitio A se encuentra forzado en su posición cuando forma parte del complejo ternario (**A**) respecto a cuando ya se encuentra acomodado (**B**).

La subunidad pequeña del ribosoma está involucrada en la unión del mRNA y del anticodón del tRNA. Su función es discriminar entre los aa-tRNA en el sitio A durante la traducción del código genético. El modelo de un sitio en la subunidad 30S que reconoce el apareamiento codón-anticodón se propuso en la década de los 60 (Davies y cols., 1964) e implica que el ribosoma distingue apareamientos correctos de incorrectos de la misma forma que las enzimas discriminan entre sustratos correctos e incorrectos, por interacciones que dependen de la geometría del sustrato (Eigen y de Maeyer, 1966). Las interacciones adicionales con el sustrato correcto llevarían a un incremento de la especificidad del apareamiento de bases. Posteriormente se propuso que el ribosoma reconociera directamente los grupos 2' OH de la ribosa del codón cuando el apareamiento fuera correcto (Potapov, 1982). Sin embargo, recientemente se ha postulado (Ogle y cols., 2005) que los modelos anteriores son difíciles de explicar con el hecho de que hay mutaciones que afectan la fidelidad de la traducción a pesar de encontrarse en sitios distantes (incluso en la otra subunidad) de la región de reconocimiento codón-anticodón. El modelo propuesto por Ogle y cols cambia el reconocimiento geométrico por un modelo basado en cinética.

En cuanto que la molécula de tRNA iniciadora que va unida a la subunidad pequeña encuentra el codón de iniciación en la molécula de mRNA, los diferentes factores de iniciación que previamente se habían asociado con la subunidad pequeña del ribosoma se liberan, permitiendo que una subunidad grande del ribosoma se una con la pequeña. Debido a que la molécula de tRNA iniciador está unida en el lugar P del ribosoma, la síntesis de la cadena proteica puede iniciarse directamente mediante la unión de una segunda molécula de aminoacil-tRNA al lugar A del ribosoma. De esta forma se ensambla un ribosoma completo y funcional con una cadena de mRNA engarzada. A continuación se desarrollan las etapas posteriores de la fase de elongación de la síntesis de proteínas (Fig. 2).

El proceso de elongación de la cadena polipeptídica sobre un ribosoma se puede considerar como un ciclo de etapas discretas, se encuentra resumido en la Figura 2.

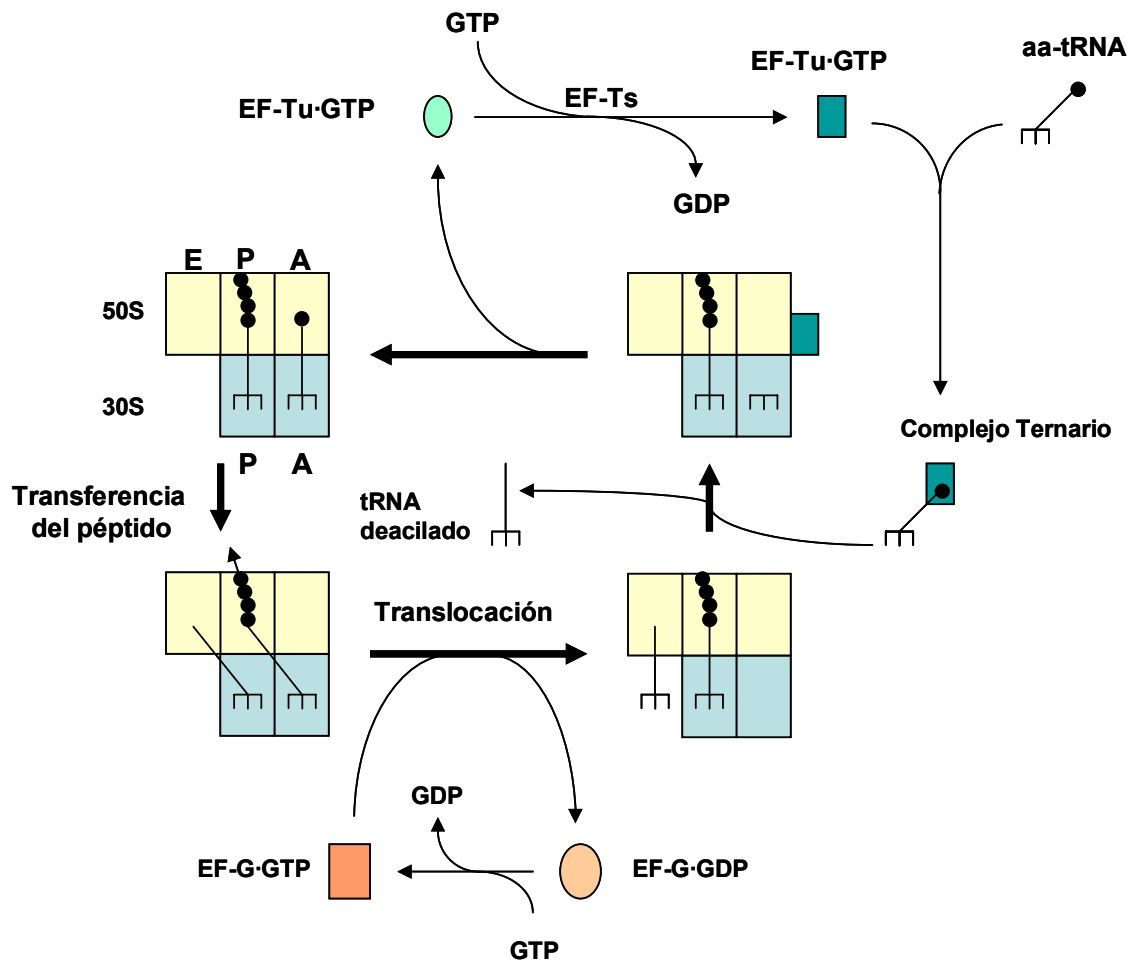


Figura 2: Modelo simplificado de elongación de la traducción. Se muestran los estados híbridos de la unión del tRNA en las subunidades 50S y 30S. A y P son los sitios aceptor y peptidil, respectivamente, en ambas subunidades. E es el sitio de salida de la subunidad 50S. Una molécula de aminoacil-tRNA (aa-tRNA) se une en un complejo con el factor de elongación Tu (EF-Tu) y GTP, formando el complejo ternario. A continuación se comprueba el correcto apareamiento del aa-tRNA con el codón del mRNA en el sitio A. El complejo ternario puede disociarse o, en el caso de que sea correcto, puede ser aceptado, en cuyo caso el GTP es hidrolizado, EF-Tu y GDP se disocian del ribosoma y el aa-tRNA se une al sitio de codificación. El subciclo de EF-Tu se completa con la regeneración del complejo ternario a partir de EF-Tu, otro aa-tRNA y GTP, el cual se ha regenerado a partir de GDP y P_i . El factor de elongación EF-Ts es crucial en la regeneración del complejo ternario a partir del complejo EF-Tu-GDP. A continuación, el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica se desacopla de la molécula de tRNA del lugar P y se une a través de un enlace peptídico al aminoácido que se halla unido a la molécula de tRNA que se halla en el lugar A. Esta reacción central de la síntesis de proteínas está catalizada por una peptidil transferasa. El avance del ribosoma sobre el mRNA es mediado por el factor de elongación G (EF-G) en un complejo con GTP. El complejo del peptidil-tRNA unido al mRNA en el codón que acaba de ser traducido se mueve a una posición nueva del ribosoma, dejando el siguiente codón en el sitio de codificación listo para un nuevo ciclo de elongación. El EF-G y el GDP que son liberados durante la translocación son regenerados como un complejo EF-G-GTP en preparación de futuros ciclos de translocación. La cadena peptídica naciente sale del ribosoma por el sitio E. Modelo modificado a partir del publicado por Kurland (Kurland y cols., 1996).

Ambas subunidades actúan conjuntamente durante el proceso de translocación, que comprende el movimiento del mRNA con respecto al ribosoma. Como una parte del proceso de translocación de la molécula libre de tRNA que se ha generado en el lugar P se libera del ribosoma y vuelve a formar parte del acervo citoplasmático de moléculas de tRNA. Así, al completarse un ciclo entero de traducción, el lugar A, que se halla desocupado, puede aceptar una nueva molécula de tRNA unida al siguiente aminoácido, la cual vuelve a iniciar de nuevo el ciclo. Se ha sugerido que los cambios en la estructura de la subunidad 30S durante la traducción, al menos entre dos estados distintos, pueden afectar la correcta traducción del mensaje genético (Lodmell y Dahlberg, 1997).

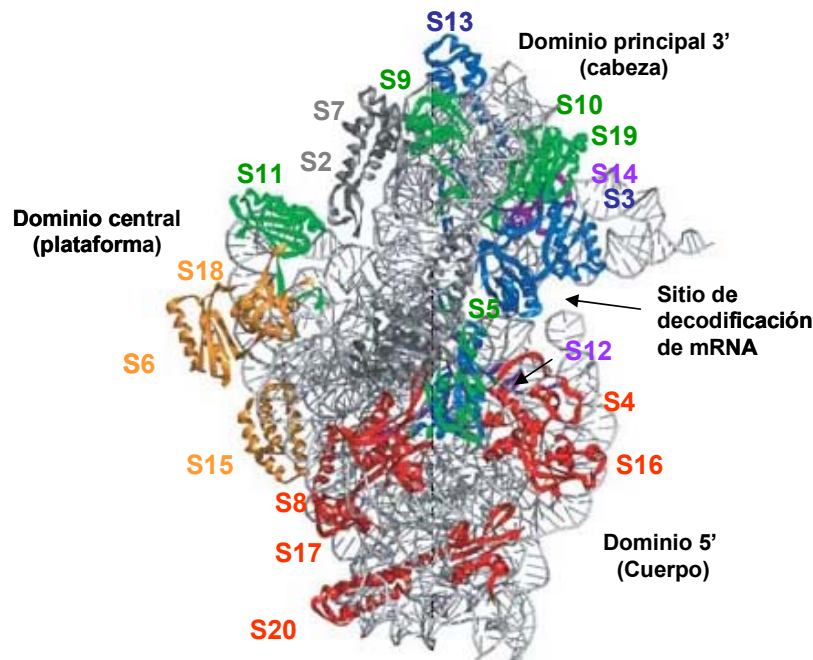


Figura 3: Subunidad 30S del ribosoma de *T. thermophilus*. En color gris se muestra el rRNA 16S, los diferentes colores indican la tasa de unión de las diferentes proteínas durante el ensamblaje de la subunidad 30S (Talkington y cols., 2005).

1.4.1 Inhibidores de la síntesis de proteínas útiles como antibióticos

Muchos de los antibióticos más eficaces utilizados en la medicina moderna actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Algunos de estos fármacos aprovechan las diferencias estructurales y funcionales que existen entre los ribosomas de procariotas y de eucariotas, con el fin de afectar preferentemente a los ribosomas de procariotas. Esta selectividad permite utilizar algunos de estos compuestos en el

cuerpo humano a concentraciones relativamente elevadas sin que resulten demasiado tóxicos. Debido a que los diferentes antibióticos se unen a regiones diferentes de los ribosomas bacterianos, a menudo inhiben pasos diferentes del proceso de síntesis. Algunos ejemplos son la tetraciclina, que bloquea la unión de los aa-tRNA al sitio A del ribosoma, el cloranfenicol, que bloquea la reacción de la peptidil transferasa en los ribosomas, La eritromicina, que bloquea la reacción de translocación en los ribosomas, la higromicina B, que interfiere en la translocación y la estreptomicina, que impide la transición desde el complejo de iniciación a la elongación de la cadena por el ribosoma y provoca errores de decodificación mediante la incorporación de aminoácidos incorrectos (Davies y cols., 1964). En este último caso hay pruebas acerca de la acción de la estreptomicina desde un punto de vista cinético; se ha visto que la estreptomicina disminuye la activación de GTPasa y la acomodación de aa-tRNA correctos mientras que incrementa la de aa-tRNA no correctos (Rodnina y cols., 2002; Gromadski y Rodnina, 2004).

Algunos de estos antibióticos aminoglucósidos, entre los que se incluyen la estreptomicina, kanamicina y neomicina, se unen a la subunidad 30S del ribosoma en zonas, no solapantes entre sí, pero cercanas al centro funcional (Carter y cols., 2000). Por ejemplo, los antibióticos kanamicina y neomicina contactan exclusivamente con la hélice 44 del rRNA 16S (Fourmy y cols., 1996; Vicens y Westhof, 2002), así como la Higromicina B (Brodersen y cols., 2000; Pfister y cols., 2003; McGaha y Champney, 2007). Por otra parte, la estreptomicina contacta con múltiples elementos estructurales de la subunidad 30S, incluyendo la proteína S12 y las hélices 1, 18, 27 y 44 del rRNA 16S (Carter y cols., 2000).

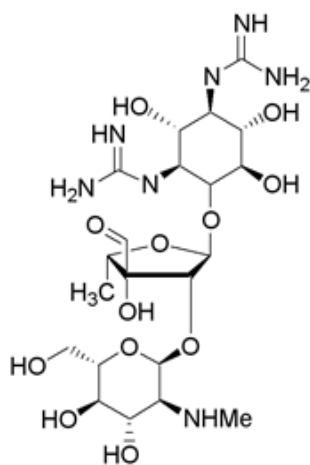


Figura 4: Estructura de la estreptomicina. Este antibiótico fue el primer aminoglucósido descubierto, deriva de la actinobacteria *Streptomyces griseus*. Aislado en 1943, fue el primer antibiótico utilizado contra la tuberculosis.

No está claro del todo el mecanismo por el cual algunas mutaciones ribosómicas confieren resistencia a estreptomicina. Algunas de estas mutaciones

están situadas en posiciones del ribosoma que no hacen contacto directo con la estreptomicina. Se ha visto que la mutación A1408G en la hélice H44 del rRNA 16S produce resistencia a estreptomicina en *T. thermophilus* aún cuando el antibiótico no tiene contacto directo con A1408, que se encuentra en el lado opuesto de la hélice (Gregory y cols., 2005), sino con C1490 y G1491. A1492 y A1493 participan directamente en el reconocimiento codón-anticodón durante el proceso de selección de tRNA, lo que provoca un cambio de una conformación “cerrada” o “arropada” (“tucked in”) a una conformación “abierta” o “excitada” (“flipped out”) (Ogle y Ramakrishnan, 2002). En la posición “arropada, A1492 y A1493 se encuentran apiladas en la hélice H44; además, 1493 aparea con A1408 (Wimberly y cols., 2000; Lynch y Puglisi, 2001). En presencia de estreptomicina este cambio de conformación se ve impedido, pero se ha propuesto que la mutación A1408G favorece una conformación que sobrepone la inhibición impuesta por la Estreptomicina (Fig. 5).

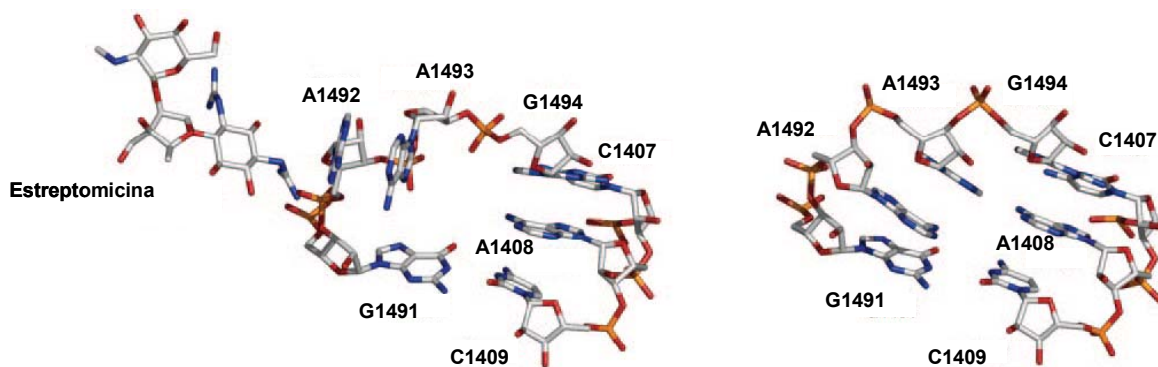


Figura 5: Hélice H44 del rRNA 16S. Representación de parte de la hélice H44 del rRNA 16S de la subunidad 30S del ribosoma. La posición de A1492 y A1493 cambia en la conformación “excitado” (PDB 1FJG) (izquierda) respecto a la posición en la conformación “arropado” (PDB 1J5E) (derecha) (Wimberly y cols., 2000).

Los ribosomas de los mutantes resistentes/dependientes a estreptomicina son en muchas ocasiones más restrictivos debido a una edición (“proofreading”) superior a lo habitual (mutaciones *str*). Esto es en gran medida una manifestación de la reducción de afinidad de unión del complejo ternario al ribosoma (Bohman y cols., 1994; Bilgin y cols., 1992; Ogle y cols., 2005). La pérdida de eficiencia cinética resultante causa una reducción en la procesividad (tasa de elongación) y una tasa de crecimiento reducida (Ruusala y cols., 1984). El fenotipo restrictivo (edición incrementada) puede describirse como una reducción de los errores de traducción a expensas de una procesividad óptima. Además de estas mutaciones *str*, hay otro tipo de mutaciones,

ram (“ribosomal ambiguity”), que no son restrictivos e introducen una alta tasa de errores durante la traducción. Estas mutaciones *ram* se encontraron en las proteínas S4 (Zimmerman y cols., 1971) y S5 (Hasenbank y cols., 1973; Piepersberg y cols., 1975) y podrían interferir la interacción mediante puentes salinos entre las proteínas S4 y S5 en la forma abierta de la subunidad 30S. Al cerrarse este dominio la interacción se ve interferida por un movimiento de separación entre ambas proteínas (Ogle y Ramakrishnan, 2002). La ruptura de los enlaces podría contribuir al coste energético de llegar a una estructura cerrada. Si esa interacción entre S4 y S5 se viera interferida debido a las mutaciones *ram*, el coste energético sería más bajo y podría resultar en una mayor probabilidad de que un aa-tRNA no correcto cerrara la estructura, lo que llevaría a una selección incorrecta (Ogle y cols., 2005). Los mutantes restrictivos tienen un efecto opuesto. Examinando la estructura de la proteína S12 y del rRNA 16S, se ve que en la forma cerrada se producen contactos adicionales entre ellas, lo cual lleva a su estabilización. Las mutaciones que interfieren estos contactos adicionales podrían llevar a la desestabilización de la forma cerrada e incrementar la barrera energética para su formación, lo que llevaría a un incremento en la exactitud de la traducción aún a expensas de la velocidad. (Ogle y cols., 2005).

1.4.2 Proteína S12

El operón *str* es uno de los más conservados en la evolución de los organismos procariotas (Itoh y cols., 1999; Koonin y Galperin, 1997). Está compuesto por cuatro genes: *rpsL* (que codifica la proteína ribosómica S12), *rpsG* (proteína ribosómica S7), *fus* (factor de elongación G, EF-G) y *tufA* (factor de elongación Tu, EF-Tu). El operón se transcribe desde su propio promotor (Post y cols., 1978) y está sometido a control traduccional por parte de uno de los componentes que codifica (S7).

La proteína ribosomal S12 es una proteína altamente conservada localizada en el centro funcional de la subunidad 30S del ribosoma. A partir de cristales de alta resolución de la subunidad 30S de *T. thermophilus* se ha visto que la proteína S12 juega un papel importante en el proceso de selección del tRNA (Carter y cols., 2000; Ogle y Ramakrishnan, 2002; Wimberly y cols., 2000, Vila-Sanjurjo y cols., 2007). Durante el proceso de selección del tRNA se producen contactos sucesivos entre la proteína S12 con algunos elementos estructurales importantes del rRNA 16S (Carter y cols., 2000; Ogle y Ramakrishnan, 2002) y con la subunidad 50S (Wimberly y cols., 2000) (Fig. 6). Hay pruebas de que la proteína ribosomal S12 modula un cambio conformacional en la hélice 27 (H27) del rRNA 16S (Lodmell y Dahlberg, 1997) y

puede influir en un equilibrio dinámico entre dos estados conformacionales alternos del ribosoma durante el ciclo de elongación (Allen y Noller, 1989; Lodmell y Dahlberg, 1997). Se ha visto que algunas mutaciones en S12 estimulan la translocación no enzimática (independiente de EF-G) (Asatryan y Spirin, 1975). Se piensa que las mutaciones conocidas en S12 que afectan la precisión de la lectura lo hacen porque afectan la estabilidad de dichas interacciones.

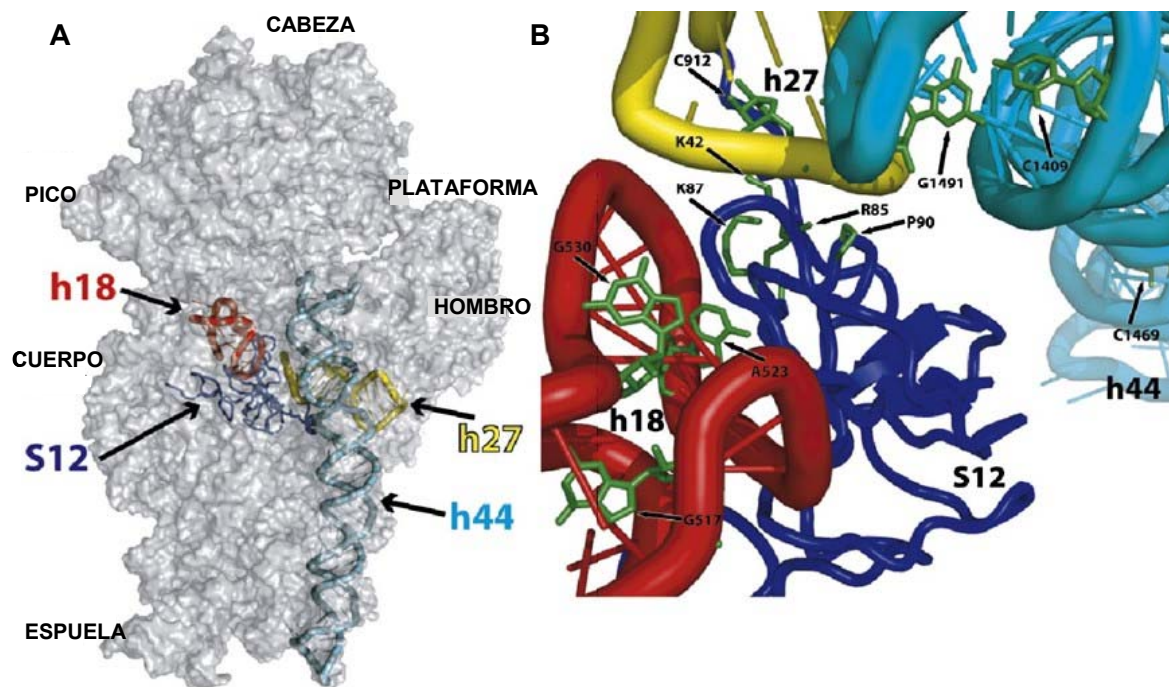


Figura 6: Subunidad 30S de *E. coli*. (A) y zona de codificación del ribosoma **(B)**. Las hélices H18, H27 y H44 del rRNA 16S están coloreadas de rojo, amarillo y cian respectivamente. La proteína S12 está coloreada de azul oscuro. Los nucleótidos y aminoácidos se muestran en color verde.

Las mutaciones en el gen *rpsL*, que codifica la proteína S12, a menudo afectan la respuesta de la célula a estreptomicina, que causa errores de lectura del código genético. Se conocen distintos fenotipos según la respuesta de la célula a la estreptomicina, incluyendo sensibilidad, resistencia, pseudo-dependencia, dependencia e independencia (Gale y cols., 1981; Gregory y cols., 2001). Estas mutaciones se encuentran agrupadas en dos zonas de la proteína S12 que están muy próximas a H18, H27 y H44, que son elementos clave del rRNA 16S (Fig. 7). Las mutaciones en H18 y H27 también confieren resistencia a estreptomicina en varios organismos (Powers y Noller, 1991; Lodmell y cols., 1995; Triman y cols., 1998) y la conformación de H27 y H44 se ve perturbada por algunas mutaciones en S12 que confieren dependencia a estreptomicina (Allen y Noller, 1989). La severidad del

fenotipo puede ser entendida en el contexto de la transición abierta-cerrada que se produce durante la selección del tRNA (Ogle y Ramakrishnan, 2002). Estas mutaciones pueden perturbar el equilibrio conformacional hacia el estado abierto en diversos grados, con las mutaciones que causan dependencia como las más severas (Ogle y Ramakrishnan, 2002). En este caso la estreptomicina puede actuar reestableciendo el equilibrio. Los fenotipos de pseudo-dependencia y algunos de resistencia pueden alterar también este equilibrio aunque en un grado menor. Poco se conoce acerca de la base estructural de la dependencia a estreptomicina o acerca de la naturaleza de las alteraciones de la cadena lateral que pueden influenciar este fenotipo; se ha visto que una mutación en un aminoácido concreto de la proteína S12 confiere dependencia o resistencia a estreptomicina dependiendo del tamaño de la cadena lateral del aminoácido cambiado (Gregory y cols., 2001; Carr y cols., 2005). Por ejemplo, los ribosomas mutantes de *E. coli* que portan en la proteína S12 las mutaciones P90R, P90L, P90E, P90M y P90W confieren un fenotipo de dependencia a estreptomicina; por otro lado, los mutantes con cadenas laterales más pequeñas, como P90A, P90G y P90C, confieren un fenotipo de resistencia a estreptomicina.

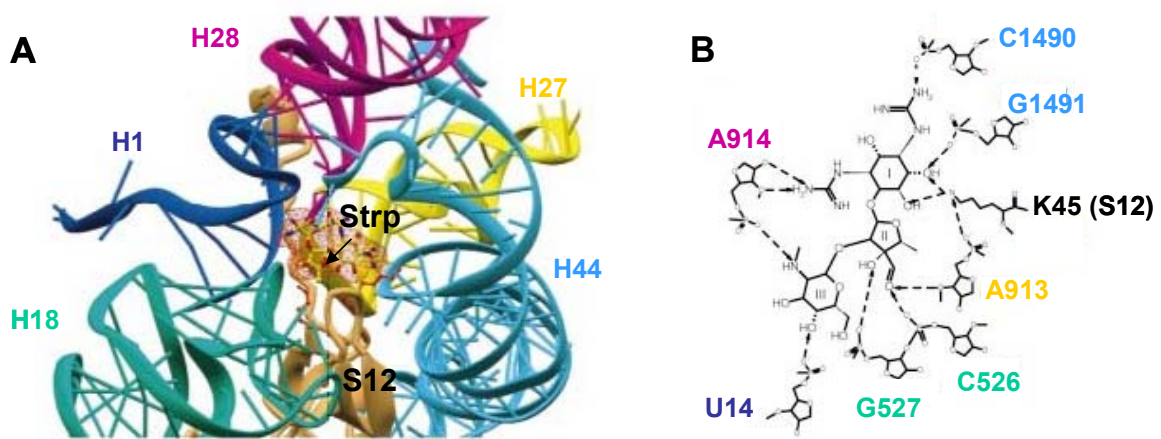


Figura 7: Interacción de la Estreptomicina con la subunidad 30S. A) Sitio de unión de la estreptomicina, se muestra la interacción con H1, H18, H27, H44 y la proteína S12. **B)** Estructura química de la estreptomicina, se muestran las interacciones de varios grupos con residuos específicos del ribosoma.

No todas las mutaciones que confieren un fenotipo respecto a estreptomicina se reducen a un único cambio de aminoácido. Se ha descrito un proceso en *E. coli* por el cual se produce una segunda mutación en el gen *rpsL* de bacterias con una mutación previa que les confería dependencia a estreptomicina (Timms y Bridges, 1993). Estas mutaciones auxiliares parece que se producen pocas generaciones después de la primera mutación en alguna clase de proceso de hipermutación.

Aunque las mutaciones espontáneas en las que se produce una sustitución de una base varían según el tipo de secuencia, se considera que se trata de un evento inusual ($10^{-9} - 10^{-10}$ por par de bases y generación, $10^{-6} - 10^{-7}$ por gen) que se produce al azar entre los diferentes genes, excepto en colonias viejas en placa, donde se han encontrado tasas de mutación anormalmente superiores tras varios días (Cairns y cols., 1988). El hecho de que se acumulen mutaciones auxiliares en S12 es por tanto muy improbable y solo puede ser debido a algún proceso de hipermutación y selección.

1.5 GFP COMO HERRAMIENTA DE LOCALIZACIÓN Y SELECCIÓN

La proteína verde fluorescente (GFP, “Green Fluorescent Protein”) es una proteína de 238 aminoácidos que es fluorescente de manera espontánea; fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura y cols., 1962). El clonaje de *gfp* y la demostración de que GFP podía expresarse funcionalmente en procariotas (*E. coli*) y eucariotas (*Caenorhabditis elegans*) (Chalfie y cols., 1994) abrieron nuevas vías de investigación en Biología Celular, Molecular y del Desarrollo. GFP ha sido expresada en bacterias, levaduras, hongos, plantas, *Drosophila*, pez cebra y células de mamífero (Yang y cols., 1996). Desde entonces se ha utilizado GFP como marcador de proteínas ya que una amplia variedad de proteínas conservan su función nativa incluso estando fusionadas en los extremos N-terminal o C-terminal con GFP (Tsien, 1998; Zimmer, 2002; Giepmans y cols., 2006). La estrategia general para la construcción de fusiones con GFP es mediante PCR para introducir dianas de restricción tanto en *gfp* como en el gen de interés para crear fusiones en plásmidos recombinantes. El gen reportero *gfp* puede fusionarse en el extremo 5' o 3' del gen de interés para crear fusiones amino- o carboxilo- terminal respectivamente. La elección de uno u otro se hace a menudo por predicción de qué región de la proteína tolerará con mayor probabilidad la adición de aminoácidos adicionales sin pérdida de función. En el caso de fusiones de GFP con proteínas de membrana, GFP debe estar unida a un dominio que esté expuesto al lado citoplasmático de la membrana. En ocasiones también es necesario añadir una secuencia de nexa o unión entre la proteína de interés y GFP para evitar interferencias no deseadas (Prescott y cols., 1999).

Mediante esta aplicación se han podido resolver muchas preguntas acerca de la organización subcelular de las células bacterianas, que no habían podido resolverse previamente en parte debido a su pequeño tamaño (Tabla 2). El estudio tradicional de

la localización macromolecular en bacterias incluye microscopía de inmunofluorescencia e inmunomarcaje con oro. Aunque estos métodos se han utilizado con efectividad, su uso está limitado al requerimiento de anticuerpos específicos contra la proteína de interés. Los anticuerpos contra proteínas de baja expresión pueden ser difíciles de obtener; además requieren la fijación de las células, lo que impide la investigación de células vivas. Por otro lado, las fusiones de *gfp* con proteínas de interés pueden construirse con relativa facilidad y en general su sensibilidad es superior a la de la detección molecular. También se encontraron limitaciones a su uso: la GFP silvestre formaba cuerpos de inclusión a 37° C, la formación del cromóforo era lenta, la intensidad de la señal era relativamente baja y se requerían de filtros especializados para una excitación óptima, aunque la mayor parte de estos problemas han sido superados (Phillips, 2001).

Procesos celulares	Proteína y función (fuente)	Referencia
División celular y septación	FtsZ – División celular (<i>E. coli</i>)	Sun y Margolin, 1998
Partición de cromosomas	<i>E. coli</i>	Webb y cols., 1998
Proteínas de partición de cromosomas y plásmidos	ParC (topoisomerasa IV)(<i>B. subtilis</i>)	Huang y cols., 1998
Replicación de DNA y estructura	SeqA – Inicio replicación (<i>E. coli</i>)	Brendler y cols., 2000
Partición de plásmidos	Plásmidos multicopia (<i>E. coli</i>)	Pogliano y cols., 2001
Exportación de proteínas	Exportación Sec-dependiente (<i>E. coli</i>)	Feilmeier y cols., 2000
Transducción de señales	CckA – Quinasa (<i>C. crescentus</i>)	Jacobs y cols., 1999
Esporulación	SigE – Factor Sigma (<i>B. subtilis</i>)	Ju y cols., 1998
Transcripción y traducción	Proteína ribosómica S2 (<i>B. subtilis</i>)	Lewis y cols., 2000

Tabla 2: Ejemplos de fusiones proteína-GFP. Se muestran algunos ejemplos utilizados para la caracterización de procesos celulares bacterianos.

Desde hace años se han generado diversas variantes de GFP que pliegan de manera más eficiente que la GFP silvestre. Una variante, llamada frGFP (“folding reporter”), porta las mutaciones F99S, M153T y V163A (Cormack y cols., 1996) y las mutaciones F64L y S65T de la eGFP (“enhanced”) (Patterson y cols., 1997). Recientemente se ha encontrado otra variante, llamada sGFP (“superfolder”), que contiene todas las mutaciones de frGFP y seis nuevas mutaciones: S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V Y A206V (Pédelacq y cols., 2006) (Fig. 8). sGFP pliega eficientemente cuando se fusiona a polipéptidos de mal plegamiento (Pédelacq y cols., 2006). Además, sGFP muestra una tolerancia incrementada a la permutación circular, mayor resistencia a desnaturalizantes químicos y una cinética de plegamiento superior respecto a frGFP. sGFP pliega unas 3.5 veces más rápido que frGFP, es más estable por 2.3 kcal mol⁻¹ ΔG(H₂O) y exhibe una interferencia al plegamiento menor de los polipéptidos fusionados.

Uno de los problemas no superados ha sido el disponer de una GFP funcional a altas temperaturas para poder ser utilizada en organismos termófilos, como *T. thermophilus*, y poder así conocer más acerca de la organización subcelular de las células bacterianas.

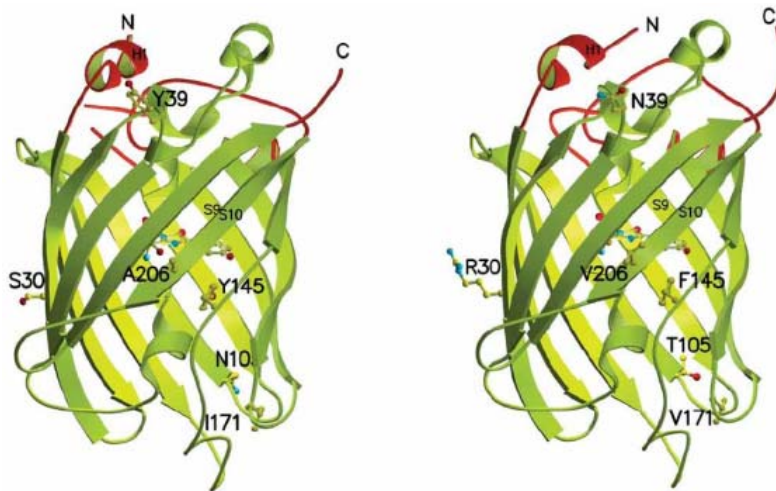


Figura 8: Estructura 3D de variantes de GFP. Se muestra la estructura de frGFP (izquierda) y sGFP (derecha). Los aminoácidos señalados indican los aminoácidos de frGFP (izquierda) y su correspondiente mutación para dar sGFP (derecha).

1.6 INTERFERÓN GAMMA HUMANO

La familia de los interferones (IFNs) fue descubierta originalmente como agentes que interferían en la replicación viral (Isaac y Lindermann, 1957). Inicialmente se clasificaron según el tipo de célula secretora pero ahora se clasifican en tipo I y tipo II (recientemente se ha añadido un tipo III aunque no está tan aceptado como los otros dos tipos) según la especificidad a receptores y la homología de secuencia. Los IFNs de tipo I están compuestos por múltiples subtipos de IFN- α (14-20, dependiendo de las especies), IFN- β , IFN- ω e IFN- τ , todos los cuales están relacionados estructuralmente y se unen a un receptor heterodimérico común (IFNAR) (Schroder y cols., 2004). Aunque los IFNs tipo I son secretadas a niveles bajos por casi todos los tipos de células, las hematopoyéticas son los mayores productores de IFN- α e IFN- ω , mientras que los fibroblastos son los productores mayoritarios de IFN- β (Bach y cols., 1997).

El IFN- γ es el único tipo de IFN tipo II, no está relacionado estructuralmente con los IFNs tipo I, se une a un receptor diferente y está codificado por un locus cromosómico

diferente. Inicialmente se pensaba que las células Th1, linfocitos citotóxicos y células NK eran las únicas productoras de IFN- γ (Young, 1996; Bach y cols., 1997). Sin embargo, en la actualidad existen indicios de que otros tipos celulares, como células B y células presentadoras de antígenos (APCs) secretan IFN- γ (Schroeder y cols., 2004). La producción por APCs actuando localmente puede ser importante en la auto-activación celular y en la activación de células cercanas. La secreción de IFN- γ por células NK y posiblemente por APCs seguramente es importante en la defensa temprana del hospedador contra infecciones, mientras que los linfocitos T se convierten en la mayor fuente de IFN- γ durante la adaptación de la respuesta inmune (Schroeder y cols., 2004).

Recientemente se ha descubierto un tercer tipo de IFN, el tipo III, que engloba 3 subtipos de IFN- λ (Vilcek, 2003).

La producción de IFN- γ es controlada por citoquinas secretadas por las APCs, sobre todo IL-12 e IL-18. Estas citoquinas sirven como puente entre la infección y la producción de IFN- γ durante la respuesta inmune innata (Schroeder, 2004). El reconocimiento de muchos patógenos por parte de los macrófagos induce la secreción de IL-12 y de quimioquinas, que atraen a las células NK al lugar de la inflamación; IL-12 por su parte promueve la producción de IFN- γ en las células NK. En macrófagos, células T y NK, la combinación de la estimulación de IL-12 e IL-18 incrementa aún más la producción de IFN- γ (Schroeder y cols., 2004). Los reguladores negativos de la producción de IFN- γ incluyen IL-4, IL-10, TGF- β y glucocorticoides.

El IFN- γ se emplea actualmente como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis intersticial pulmonar (Ziesche y cols., 1996) y la granulomatosis (Bolinger y Taeubel, 1992) gracias a su actividad antiviral, antitumoral (Schroeder y cols., 2004) e inmunoreguladora (Gray y Goeddel, 1982). Es una glicoproteína de 166 aminoácidos cuya secuencia fue publicada en 1982. Tiene actividad biológica como homodímero (34-50 kDa) y está formado por dos subunidades peptídicas unidas no covalentemente (Farrar y Schreiber, 1993). La estructura 3D (Thiel y cols., 2000) muestra que cada una de las subunidades consta de seis alfa-hélices y dos sitios potenciales de N-glicosilación en las posiciones 48 y 120 (Aggarwal, 1992) (Fig. 9). De todos los interferones, la estabilidad a la temperatura del IFN- γ humano es la más baja (temperatura de desnaturalización de 52° C) y con la vida media más corta.

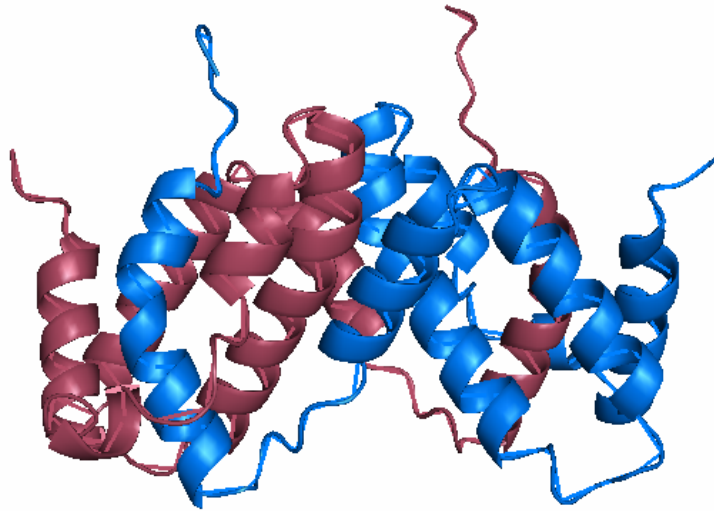


Figura 9: Estructura 3D del Interferón Gamma (IFN- γ) humano. Cada una de las dos cadenas del homodímero se muestra de un color.

OBJETIVOS

Los organismos termófilos o hipertermófilos están cobrando un gran interés en diversos campos, con aplicaciones biotecnológicas, industriales y como modelos en biología estructural. En cuanto a aplicaciones biotecnológicas se refiere, en la actualidad se han clonado, secuenciado y caracterizado más de 50 DNA polimerasas de termófilos e hipertermófilos para su uso en la técnica de PCR, destacando la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), *T. thermophilus* (Tth) y las procedentes de las arqueas hipertermófilas *Pyrococcus furiosus* (Pfu) y *Pyrococcus woesei* (Pwo). En la industria, se están empezando a emplear con éxito diversas enzimas procedentes de microorganismos termófilos o hipertermófilos, como α -amilasas (*Thermus spp*), β -amilasa (*Clostridium thermosulfurogenes*), pululanasa y celulasas (*P. furiosus*), β -galactosidasas (*Thermus* y *Thermotoga*), proteasas (*B. stearothermophilus*), entre otros. En cuanto a sus aplicaciones en biología estructural es interesante destacar la cristalización del ribosoma 70S y la RNA polimerasa de *T. thermophilus*.

Estos datos muestran que este tipo de microorganismos son muy importantes como modelos biológicos, por lo que sería muy interesante disponer de un mayor número de herramientas para su estudio, ya que en la actualidad aún son escasas. Para aumentar el número de herramientas deseables disponibles para trabajar con estos microorganismos, en especial con *T. thermophilus*, hemos propuesto como principales objetivos de este trabajo:

1. Desarrollar vectores con marcadores de resistencia alternativos a la kanamicina.
2. Desarrollar marcadores termoestables de localización en *T. thermophilus*.
3. Diseñar sistemas de selección de proteínas termoestables basados en su crecimiento en *T. thermophilus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Cepas utilizadas

Las cepas de *E. coli* y *T. thermophilus* empleadas en este trabajo se describen en la tabla 3.

Tabla 3: Cepas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	Rosenberg y cols., 1987
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZM15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia
<i>T. thermophilus</i> NAR1	Silvestre. Elemento NCE. Facultativo	Cava y cols., 2007
<i>T. thermophilus</i> HB27	Silvestre. Aerobio	Cedida por el Dr. Koyama
<i>T. thermophilus</i> HB27c	<i>T. thermophilus</i> HB27 <i>Cam^r::nar</i> transferido por conjugación. Facultativo	Ramírez-Arcos y cols., 1998b
<i>T. thermophilus</i> HB27 Δ <i>leuB</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27 Δ <i>leuB</i> . Facultativo	Datos de laboratorio (M. Sánchez)
<i>T. thermophilus</i> HB27c Δ <i>leuB</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27 transformado con <i>nar</i> y eliminado el gen <i>leuB</i>	Datos de laboratorio (M. Sánchez)
<i>T. thermophilus</i> HB27c <i>narC</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27c:: <i>nar</i> , <i>narC</i> :: <i>kat</i>	Zafra y cols., 2002
<i>T. thermophilus</i> CKN2	<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>narC</i> :: <i>kat</i> .	Zafra y cols., 2002
<i>T. thermophilus</i> HB27 <i>phoA</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27 <i>phoA</i> :: <i>kat</i>	Moreno y cols., 2003
<i>T. thermophilus</i> HB27c <i>phoA</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27c <i>phoA</i> :: <i>kat</i>	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> HB27c <i>csaB</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27c <i>csaB</i> :: <i>kat</i>	Cava y cols., 2004
<i>T. thermophilus</i> HB27 <i>gfh1</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27 Δ <i>leuB gfh1</i> :: <i>kat</i>	Laptenko y cols., 2006
<i>T. thermophilus</i> Δ <i>narC</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27 Δ <i>narC</i>	Este trabajo

3.1.2 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Plásmidos utilizados.

Nombre	Marcador/Utilidad	Referencia
pUC18	Amp ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Vector de clonaje.	Vieira y Messing, 1982
pUC18Not	Amp ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Vector de clonaje. Modificado para que posea dianas de la enzima <i>NotI</i> a ambos lados del sitio de policlonaje.	Datos de laboratorio
pBluescriptKS/SK	Amp ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Vector de clonaje. Utilizado para el clonaje a romos de productos de PCR amplificados con <i>Pfu</i> .	Stratagene
PCR2.1	Amp ^r , Kan ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Promotores <i>T7</i> y <i>SP6</i> . Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR.	Invitrogen
pMK18	Kan ^r , promotor del gen <i>slpA</i> (<i>Ps</i>). Vector bifuncional, <i>Thermus-E. coli</i> .	De Grado y cols., 1999
pKT1	Amp ^r , Kan ^r bajo el promotor del gen <i>slpA</i> (<i>Ps</i>). Purificación del gen de resistencia a kanamicina para mutagénesis insercional.	Lasa y cols., 1992
pK18	Kan ^r . pUC18 modificado para sustituir la resistencia a ampicilina por kanamicina. Se intentó hacer mutagénesis por integración en <i>T. thermophilus</i> .	L. A. Fernández-Herrero (datos de laboratorio)
pNIT3Bg	Amp ^r . Derivado de pUC119. Contiene un fragmento de DNA de 4 kpb que codifica la región promotora (<i>Pnar</i>), el primer gen (<i>narC</i>) y la parte inicial del segundo gen (<i>narG</i>) del operón de la nitrato reductasa.	Sandra Ramírez, Tesis Doctoral.
pK Δ citNde	Inserto de pNIT3Bg, delecionado <i>narC</i> y añadida una diana <i>NdeI</i> en el ATG de <i>narG</i> , por PCR inversa. Se clona a <i>KpnI</i> en pK18, <i>Plac</i> y <i>Pnar</i> quedan en la misma dirección.	Zafra y cols., 2002
pMKE2	Kan ^r . Promotor de la nitrato reductasa de <i>T. thermophilus</i> HB8 (<i>Pnar</i>). Plásmido bifuncional capaz de replicar en <i>E. coli</i> y distintas especies de <i>Thermus</i> , permite la expresión controlada de genes heterólogos en <i>T. thermophilus</i> . Incluye posibilidad de fusión traduccional en el extremo carboxilo terminal.	Moreno y cols., 2003
pMKEbgaA	Derivado de pMKE por inserción del gen <i>bgaA</i> para su expresión controlada en <i>Thermus</i> . Gen testigo citoplásmico.	Moreno y cols., 2003
pMKEPA	Fosfatasa Alcalina clonada <i>NdeI/SalI</i> en el pMKE para su expresión controlada en <i>Thermus</i> . Gen testigo citoplásmico.	Moreno y cols., 2003
pGEM-T	Amp ^r . <i>Plac-lacZ'</i> Promotores <i>T7</i> y <i>SP6</i> . Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR.	Promega
pT8S-P31-hphA	Hig ^r . Vector bifuncional, <i>Thermus-E. coli</i> .	Nakamura y cols., 2005

pNCK-IFN γ M1	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína IFN- γ ::K43E, clonada a <i>NcoI/NotI</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	Lunn y cols., 1992
pNCK-IFN γ M2	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína IFN- γ ::Q133L clonada a <i>NcoI/NotI</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	Biométhodes
pNCK-IFN γ M3	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína IFN- γ que contiene un codón de parada 30 pares de bases antes del final, clonada a <i>NcoI/NotI</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	Biométhodes
pNCK-IFN γ M4	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína IFN- γ ::E30C/S92C, clonada a <i>NcoI/NotI</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	Waschutza y cols., 1996
pNCK-IFN γ Δ 10	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína IFN- γ :: Δ 10, clonada a <i>NcoI/NotI</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	Slodowski y cols., 1991
pNCK-	Derivado de pNCK, no contiene la secuencia en posición 5' del gen <i>kat</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	Biométhodes
pUC18gfh1	Derivado de pUC18 por inserción del gen <i>gfh1</i> , clonado a <i>EcoRI/Sall</i> .	Laptenko y cols., 2006
pMHbgaA	Derivado de pMH184 por inserción del gen <i>bgaA</i> clonado <i>NdeI/HindIII</i> .	Cava y cols., 2007
pMHnqobgaA	Derivado de pMHbgaA por inserción de la región promotora del operón <i>nqo</i> , clonado a <i>XbaI/NdeI</i> .	Cava y cols., 2007
pMHnarbgaA	Derivado de pMHbgaA por inserción de la región promotora del operón <i>nar</i> , clonado a <i>XbaI/NdeI</i> .	Cava y cols., 2007
pET28bglu	Derivado de pET28b por inserción del gen <i>bgl</i> , clonado a <i>NdeI/HindIII</i> .	Eloy Ferreras
pMKPnqobgaA	Derivado de pMKEbgaA por inserción del promotor del operón <i>nqo</i> en sustitución del promotor del operón <i>nar</i> , clonado a <i>XbaI/NdeI</i> .	Cava y col., 2007
pMKsGFP	Kan ^r . Vector derivado de pMK18 que expresa la forma termoestable de la GFP (<i>sgfp</i>) bajo el control del promotor <i>PslpA</i> .	Cedido por Dr. Westblade y Dr. Waldo
pMKPnarsGFP	Derivado de pMKEbgaA por inserción del gen que codifica sGFP en sustitución de <i>bgaA</i> , clonado a <i>NdeI/HindIII</i> .	Cava y cols., 2007b
pMKPnqosGFP	Derivado de pMKPnqobgaA por inserción del gen que codifica sGFP en sustitución de <i>bgaA</i> , clonado a <i>NdeI/HindIII</i> .	Cava y cols., 2007b

3.1.3 Plásmidos contruidos en este trabajo

Los plásmidos contruidos en este trabajo se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos contruidos en este trabajo.

Nombre	Marcadores/Origen / Construcción/ Usos	Figura
pMK18ΔBamHI	Derivado de pMK18 por eliminación de la diana <i>BamHI</i> del replicón de <i>Thermus</i> .	11
pMK184	Derivado de pMK18ΔBamHI por eliminación de la diana <i>BamHI</i> .	11
pMK184rpsL1	Derivado del pMK184 por inserción del gen <i>rpsL</i> clonado a <i>EcoRI/HindIII</i> desde Bluescript KS- <i>rpsL</i> . Ensayo de complementación.	24
pS18a	Str ^r . Derivado de pUC18 por inserción del gen <i>rpsL</i> en sentido contrario a <i>lacZp</i> , clonado a <i>NdeI</i> . Las dianas de restricción se añadieron al gen <i>rpsL</i> mediante PCR. Marcador de resistencia a estreptomicina.	25
pS18b	Str ^r . Derivado de pUC18 por inserción del gen <i>rpsL</i> en el mismo sentido que <i>lacZp</i> , clonado a <i>NdeI</i> . Las dianas de restricción se añadieron al gen <i>rpsL</i> mediante PCR. Marcador de resistencia a estreptomicina.	25
pS18a-narC	Derivado de pS18a por inserción del gen <i>narC</i> clonado a <i>KpnI</i> desde pNIT3Bg. Ensayo de complementación.	31
pS18a-PA	Derivado de pS18a por inserción del gen <i>phoA</i> clonado a <i>XbaI/SalI</i> desde pMKEPA. Ensayo de complementación.	31
pS18a-bgaA	Derivado de pS18a por inserción del gen <i>bgaA</i> clonado a <i>XbaI/HindIII</i> desde pMKE1bgaA. Ensayo de complementación.	31
pMS18-narC	Derivado de pMS18 por inserción del gen <i>narC</i> clonado a <i>KpnI</i> desde pNIT3Bg. Ensayo de complementación.	31
pMS18-PA	Derivado de pMS18 por inserción del gen <i>phoA</i> clonado a <i>XbaI/SalI</i> desde pMKEPA. Ensayo de complementación.	31
pMS18-bgaA	Derivado de pMS18 por inserción del gen <i>bgaA</i> clonado a <i>XbaI/HindIII</i> desde pMKEbgaA. Ensayo de complementación.	31
pS18a-gfh1	Derivado de pS18a por inserción del gen <i>gfh1</i> clonado a <i>EcoRI/SalI</i> desde pUC18gfh1. Ensayo de complementación.	31
pMS18-gfh1	Derivado de pMS18 por inserción del gen <i>gfh1</i> clonado a <i>EcoRI/SalI</i> desde pUC18gfh1. Ensayo de complementación.	31
pMS18	Derivado de pUC18 por inserción del replicón de <i>Thermus</i> (<i>repA</i>), clonado a <i>NdeI</i> desde pMK184. Dianas de restricción <i>NdeI</i> añadidas al gen <i>repA</i> por PCR. Marcador de resistencia a estreptomicina multicopia.	28
pS18aΔnarC	Derivado de pS18a por inserción a <i>KpnI</i> del fragmento ΔcitNde desde pKΔcitNde. Utilizado para la generación del mutante <i>T. thermophilus</i> HB27 Δ <i>nar</i> .	Descrito en 4.2.11
pMK184narC	Derivado de pMK184 por inserción del gen <i>narC</i> clonado a <i>KpnI</i> desde pNIT3Bg. Ensayo de complementación.	Descrito en 4.2.11

pMH184	Hig ^r . Derivado de pMK184 por inserción del gen <i>hph</i> clonado a <i>NdeI/BglII</i> . Las dianas de restricción se añadieron al gen <i>hph</i> mediante PCR. Marcador de resistencia a higromicina.	12
pUC18Rep	Derivado de pUC18 por inserción del replicón de <i>Thermus</i> (<i>repA</i>), clonado a <i>NdeI</i> desde pMS18. <i>repA</i> se encuentra en sentido contrario a <i>Plac</i> . Paso intermedio para el clonaje de pNCK.	39
pUC18RepKAT	Derivado de pUC18Rep por inserción del gen <i>kat</i> , clonado a <i>BamHI</i> desde pKT1. El gen <i>kat</i> se encuentra en sentido contrario a <i>Plac</i> . Comprobación de funcionamiento del sistema basado en pNCK.	39
pNCK	Derivado de pUC18 por inserción del gen <i>kat</i> , clonado a <i>EcoRI/HindIII</i> desde pUC18Rep. En posición 5' del gen <i>kat</i> se encuentra una secuencia que codifica 9 aminoácidos. Generación de genotecas para ensayos de termoestabilidad.	39
pNCK-IFN γ	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína IFN- γ , clonada a <i>NcoI/NotI</i> . Control en ensayos de termoestabilidad.	39
pMHbglu	Derivado de pMH184 por inserción del gen <i>bgl</i> , clonado a <i>XbaI/HindIII</i> .	16
pMHnqobglu	Derivado de pMHbglu por inserción de la región promotora del operón <i>nqo</i> , clonado a <i>EcoRI/XbaI</i> .	16
pMHnarbglu	Derivado de pMHbglu por inserción de la región promotora del operón <i>nar</i> , clonado a <i>EcoRI/XbaI</i> .	16
pMHPnqosGFP	Derivado de pMH184 por inserción del fragmento <i>Pnqo-sGFP</i> desde pMKPnqo-sGFP, clonado a <i>XbaI/HindIII</i> .	33
pMHPnqoeGFP	Derivado de pMHPnqosGFP por inserción del gen que codifica eGFP en sustitución del gen que codifica sGFP, clonado a <i>NdeI/HindIII</i> .	33
pMHGroE-sGFP	Derivado de pMHPnqosGFP por inserción del gen <i>hsp10</i> clonado a <i>BclI/ClaI</i> .	35
pMHPhoA-sGFP	Derivado de pMHPnqosGFP por inserción del gen <i>phoA</i> clonado a <i>BclI/ClaI</i> .	35

3.1.4 Antisueros usados en este trabajo

Los antisueros utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Antisueros utilizados.

Nombre	Características	Referencia
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano. Anticuerpo secundario en Western-blot.	Biorad
α -Gfh1	Anticuerpo policlonal de conejo contra proteína Gfh1 utilizado en ensayos de Western blot.	Laptenko y cols., 2006
α - IFN- γ	Anticuerpo policlonal de conejo contra proteína IFN- γ humana utilizado en ensayos de Western blot.	Biosource
α - GFP	Anticuerpo de conejo contra proteína GFP desnaturalizada de <i>Aqueorea victoria</i> utilizado en ensayos de Western blot.	Invitrogen

3.2 MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO.

3.2.1 Tampones y otras soluciones.

La tabla 7 resume la composición y utilidad de los tampones y otras soluciones usados en este trabajo.

Tabla 7: Tampones y otras soluciones.

Nombre	Composición	Utilidad
Tampón TAE 1x	Tris-acetato 40 mM pH 8; EDTA 1 mM	Electroforesis en geles de agarosa
Tampón TE 1x	Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM	Lavado de extractos celulares
Tampón de ruptura de Laemmli 5X	Tris-HCl 300 mM pH 6.8, SDS 5 %, β -mercaptoetanol 10 %, glicerol 50 %, azul de bromofenol 0.002%, 25 mM EDTA	Preparación de muestras de proteínas para su análisis en SDS-PAGE
Tampón de electroforesis 5X	Tris 125 mM pH 8.8, glicina 1 M, SDS 20 mM	Tampón para SDS-PAGE
Tampón de transferencia	Tris 48 mM pH 8.5, glicina 39 mM, SDS 0.037 % (p/v) y metanol 20 %	Transferencia de proteínas a membrana de PVDF en semiseco
TBS-Tween 1x	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1 %	Solución de bloqueo y dilución de anticuerpos para ensayos de Western blot
Tampón de carga de DNA 10X	TAE 10X, glicerol 30 %, 0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilencianol FF	Preparación de muestras para electroforesis de DNA

RNasa A	2 mg/ml de RNasa A en Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, glicerol 20 % y hervir durante 10 minutos para eliminar DNasas	Eliminación de RNA de muestras
TES	Tris 25 mM pH 7.5, sacarosa 50 mM, EDTA 5 mM.	Lavado de células, purificación de DNA genómico
TS 1x	Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5	Lavado de células
Tampón Z 1x	Tampón fosfato pH 7, KCl 10 mM, MgSO ₄ 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM	Actividad β-galactosidasa

3.2.2 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos usados en este trabajo se muestran en la tabla 8. En negrita se muestran las dianas de restricción que contienen.

Tabla 8: Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia 5' → 3.	Utilidad/Diana restricción
O-kat2	GAACTTCTGGAATCGC	Detección por PCR del gen <i>kat</i> .
O-kat3	GGAACGAATATTGGATA	Detección por PCR del gen <i>kat</i> .
O-kat4	AGAAATTCTCTAGCGAT	Detección por PCR del gen <i>kat</i> .
M13 dir	GTAAACGACGGCCAGT	Secuenciación de genes clonados.
M13 rev	GAAACAGCTATGACCATG	Secuenciación de genes clonados.
O-STR1	AAAAC CATATG TCCAGGCCCTCCA	Amplificación por PCR del gen <i>rpsL</i> . <i>NdeI</i> .
O-STR2	AAAAC CATATG ACGGACCTCTGCT	Amplificación por PCR del gen <i>rpsL</i> . <i>NdeI</i> .
O-STR3	AAAAC CATATG AGGTCGTA CTCTA	Secuenciación del gen <i>rpsL</i> . <i>NdeI</i> .
O-STR4	AAAC CATATG AGGTCGTA CTCTACCTTGA	Secuenciación del gen <i>rpsL</i> . <i>NdeI</i> .
O-STR5	CCAACTCGGCGCTCCGTAAGGTGG	Amplificación por PCR del gen <i>rpsL</i> (separación de mutaciones).
O-STR6	CCACCTTACGGAGCGCCGAGTTGG	Amplificación por PCR del gen <i>rpsL</i> (separación de mutaciones).
O-STR7	AAAAC CATATG CAATCAGCTCGTCCGAA	Amplificación por PCR del gen <i>rpsL</i> (a excepción de la región promotora). <i>NdeI</i> .
O-STR8	GATGAAGGCCGTGACCAG	Secuenciación del gen <i>rpsL</i> .

O-STR9	CACTGCCGACGATCAATCAGCTCGTCCGAA	Secuenciación del gen <i>rpsL</i> .
O-STR10	GATGAAGGCCGTGACCAGCACGTCCCCGTA	Secuenciación del gen <i>rpsL</i> .
OLA360	CTTGACAAGGGCGCGT	Detección por PCR del gen <i>βgaA</i> .
β-gal ext	GCCTTAAAGTCCTCTTCCCAA	Detección por PCR del gen <i>βgaA</i> .
O- β-gal	GGGGTTGGCCTGGCCA	Detección por PCR del gen <i>βgaA</i> .
O-RepNde2D	CTGTT CATATG CCTCAGTTGA	Amplificación por PCR del gen <i>repA</i> . <i>NdeI</i> .
O-RepNdeR	GGGAC CATATG CCCCTGGA	Amplificación por PCR del gen <i>repA</i> . <i>NdeI</i> .
O-132pUC	GGGGCTGGCTTAACTATG	Secuenciación de genes clonados en pUC18.
FP PnarDIR	CTGGACCAGGTGGGCGCA	Detección por PCR de la región promotora del operón <i>nar</i> .
O27-32	CCCAGCTCGCCCGGCGG	Detección por PCR del gen <i>narG</i> .
O-AP1	CTACGTCACCGAGTCCA	Detección por PCR del gen <i>phoA</i> .
IFN1	AAGGG GGATCCT GTTACTGCCAGGACCCATAT	Amplificación por PCR del gen que codifica IFNγ. <i>BamHI</i> .
IFN2	AAAGGG GCGCGC CTGGGATGCTCTTCGACCTCG	Amplificación por PCR del gen que codifica IFNγ. <i>NotI</i> .
O-P31Higro	ATTCGGCCCAAGGTTTACAAAATCC	Amplificación del gen <i>hph5</i> .
O-HigrorevBgIII	AAA AGATCT CTATTCTTTGCCCTCGGACGA	Amplificación del gen <i>hph5</i> . <i>BglII</i> .
ABamPMKDir	TCCCGGGAGCGTGCGCTT	Amplificación de pMK18 para sustituir diana <i>BamHI</i> en gen <i>repA</i> .
ABamPMKRev	TCGCGGAACCTCCCGGGCC	Amplificación de pMK18 para sustituir diana <i>BamHI</i> en gen <i>repA</i> .
O-PnarE1	CCAAGGG GAATTC GACGTA	Detección por PCR de la región promotora del operón <i>nar</i> . <i>EcoRI</i> .
PnarXbaRev	AAAT CTAGAC GCCATCACCTCCGGCCCCAGTG	Amplificación por PCR de la región promotora del operón <i>nar</i> . <i>XbaI</i> .
PnqoecoR1dir	AAAG AATTC GGCTCTTTGACCTCCCTCCAGGG	Amplificación por PCR de la región promotora del operón <i>nqo</i> . <i>EcoRI</i> .
Pnqoxbarev	AAAT CTAGACA AGGTCCCCTCCTTTCTGTGCC	Amplificación por PCR de la región promotora del operón <i>nqo</i> . <i>XbaI</i> .

NdeMCSLINKs GFPdir	CATATGCCATGGACTAGTATCGATGAATTCTCT GGAGGAGGAGGAATGAGCAAAGGAGAAGAACT TTTCACTGGAGTTGTCCC	Amplificación por PCR del gen que codifica GFP, añade sitio de clonaje y secuencia que codifica SGGGG. <i>NdeI</i> .
HindsGFPprev	AAGCTTTTATTATTTGTAGAGCTCATCC	Amplificación por PCR del gen que codifica GFP. <i>HindIII</i> .
phoABcu1dir	ACTAGTGGAGGTGAGAAACATGAAGCGAAGGG ACATCCTG	Amplificación por PCR del gen <i>phoA</i> . <i>BcuI</i> .
phoACla1rev	ATCGATGGCCCAGACGTCCTCGGGGTG	Amplificación por PCR del gen <i>phoA</i> . <i>ClaI</i> .
hsp10Bcu1dir	ACTAGTGGAGGGAGTGGATATGGCCGCGGAGG TGAAGAC	Amplificación por PCR del gen <i>groES</i> . <i>BcuI</i> .
hsp10Cla1rev	ATCGATCTGCAGGACCGCAAGCAGGTCG	Amplificación por PCR del gen <i>groES</i> . <i>ClaI</i> .

3.3 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.3.1 Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

T. thermophilus fue incubado a 60-70° C en un medio rico (TB) que contiene tripticasa (BBL) 8 g/l, extracto de levadura (Gibco) 4 g/l y NaCl 3 g/l, pH 7.5 (Fernández-Herrero, 1995a). En medios sólidos se añadió 1.5 % (p/v) de agar bacteriológico (Pronadisa) y las placas se incubaron (60-70° C) en cámara húmeda. En los experimentos de selección se incluyeron los antibióticos correspondientes a las concentraciones: kanamicina (30 µg/ml), estreptomycin (100 µg/ml), higromicina (50 µg/ml), bleomicina (50 µg/ml).

El medio mínimo utilizado para el crecimiento de *Thermus* fue el descrito por Degryse (Degryse y cols., 1978), añadiendo la mezcla de micronutrientes indicada por Tanaka (Tanaka, 1981). Cuando fue necesario añadir algún aminoácido, éste se puso a una concentración de 50 µg/ml.

E. coli fue incubado a 37° C con agitación en medio rico LB (Lennox, 1955), o en placa añadiendo 1.5 % (p/v) de agar al medio. Cuando fue necesario se incluyeron los antibióticos correspondientes a las concentraciones: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), higromicina (100 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), bleomicina (3 µg/ml).

La selección de recombinantes por actividad β-galactosidasa fue realizada añadiendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (Roche) en las placas de selección a una concentración final de 40 µg/ml.

El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió midiendo la DO₅₅₀ en un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

Las estirpes bacterianas fueron conservadas en placa a 4° C durante un máximo de un mes y durante largos periodos de tiempo a -70° C en medio de crecimiento en presencia de glicerol 30 % (v/v). Las células de *Thermus* se conservaron a -20° C en forma de precipitados compactos secos.

3.3.2 Transformación bacteriana

La competencia en *E. coli* fue inducida mediante el método de Inoue (Inoue y cols., 1990). Las transformaciones se realizaron siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1985).

Cuando se buscaban eficiencias de transformación muy altas, las células de *T. thermophilus* o *E. coli* fueron electrotransformadas. Para ello dejamos crecer los cultivos hasta una D.O.₅₅₀ de aproximadamente 0.5, los lavamos en glicerol 10 % en H₂O MiliQ (dos lavados para *E. coli*, tres lavados para *Thermus*) y resuspendimos las células en 1/100 del volumen inicial en esa misma solución. 100 µl de estas células fueron incubadas con el DNA durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente las sometimos a un pulso corto (5 ms) en un campo eléctrico de 12500 V/cm (Equibio, Easyject Plus D2000; 2500 V, 201 Ω y 25 µF, en cubetas de 0.2 cm de grosor).

Las células de *T. thermophilus* fueron transformadas por competencia natural (Koyama y cols., 1986), añadiendo 0.1-1 µg de DNA a 0.5 ml de cultivo en fase exponencial (aprox. 0.5 u.D.O.₅₅₀) en medio de crecimiento TB preparado con agua mineral Fontjaraba.

Tras la transformación, en todos los casos las células fueron incubadas a su temperatura de crecimiento el tiempo necesario para la expresión de los genes de resistencia al antibiótico correspondiente. En el caso de *E. coli*, una hora para la ampicilina y 1.5 h para la kanamicina o higromicina. En *Thermus*, las células fueron incubadas durante 4 h. Como último paso los cultivos fueron extendidos en placas de selección y los transformantes fueron crecidos 24-48 h a la temperatura correspondiente.

3.3.3 Crecimiento de *T. thermophilus* en distintas condiciones

El crecimiento en aerobiosis fue realizado en matraces rellenos con medio de cultivo hasta 1/4 de su capacidad con una agitación de 150 rpm.

En el caso de la inducción de la nitrato reductasa por microaerofilia, iniciamos el crecimiento en aerobiosis y cuando el cultivo se encontraba a 0.45-0.5 u.D.O.₅₅₀, añadimos nitrato potásico 40 mM (Merck) al medio y se paramos la agitación. De esta forma conseguimos la microaerofilia al perderse la aireación y consumirse el oxígeno disuelto en el medio. El tiempo de inducción en microaerofilia fue de cuatro horas.

En el caso de la inducción de la región promotora del operón *nqo*, iniciamos el crecimiento del cultivo en aerobiosis y lo dejamos hasta que se alcanzó la saturación en el crecimiento.

3.3.4 Fraccionamiento celular

Las células de cultivos exponenciales de *T. thermophilus* fueron sonicadas, seguido de una centrifugación suave (3000 rpm, 5 min) para eliminar células intactas. Posteriormente, las fracciones soluble y de membrana fueron separadas mediante dos pasos de centrifugación consecutivos (2000 rpm, 20 min). Las proteínas divididas bien en la fracción soluble o de membrana fueron separadas por SDS-PAGE ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis") y analizadas mediante "Western Blot". Los cuerpos celulares derivados de los cultivos del mutante *csaB::kat* (Cava y cols., 2004) fueron concentrados mediante centrifugación media (5000 rpm, 5 min), y el sedimento celular fue sometido a pipeteo repetido para romper la envuelta externa (Castán y cols., 2002). Después de la centrifugación (5000 rpm, 5 min) la fracción periplásmica fue recuperada mientras que el sobrenadante y las células fueron procesadas para separar las fracciones citoplásmica y de membrana, como en las células de la estirpe silvestre.

3.4. MANIPULACIÓN DE DNA

3.4.1 Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

El DNA plasmídico de *E. coli* fue obtenido desde cultivos saturados mediante el método de lisis alcalina (Sambrook, 1989) o bien kits basados en la unión del DNA a una columna (Wizard Plus SV Minipreps, Promega).

3.4.2 Preparación de DNA cromosómico de *Thermus thermophilus*

El DNA cromosómico de *Thermus* fue aislado a partir de 2-10 ml de cultivo en saturación, siguiendo el protocolo descrito por Marmur (Marmur, 1961). Las células recogidas por centrifugación fueron lavadas (Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM) y resuspendidas en 50 μ l de un tampón conteniendo Tris 25 mM pH 7.5, glucosa 50 mM, EDTA 5 mM, al que añadimos RNasa A 0.1 mg/ml (Roche) y lisozima 0.1 mg/ml (Roche, preparada en EDTA 0.25 M); tras 1 hora a 37° C y, posteriormente el volumen fue incrementado con TE 1X y las células fueron lisadas con sarkosil 0.5% (Sigma) y pronasa E 0.1 mg/ml (Merck) a 56° C durante una hora, seguidas de un tratamiento con proteinasa K 3 mg/ml (Sigma) a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente, las preparaciones fueron sometidas a sucesivos ciclos de congelación-descongelación a -70° C seguidos de agitación fuerte y a varias extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) y posteriormente con cloroformo:isoamílico (24:1). El DNA obtenido fue precipitado con dos volúmenes de etanol puro (Merck) o 0.7 volúmenes de isopropanol (Merck) y acetato amónico pH 5 hasta una concentración final de 100 mM, y finalmente resuspendido en 20 μ l de agua Mili-Q. Mediante este protocolo se obtienen habitualmente fragmentos de DNA de un tamaño medio de 25 kpb, apropiados para el análisis por "Southern-Blot" o para ser utilizados como molde en ensayos de PCR.

3.4.3 Precipitación de DNA

En los casos en que fue necesario precipitar DNA (plasmídico o cromosómico), añadimos dos volúmenes de etanol puro (Merck) enfriado a -20° C y acetato amónico pH 5 hasta una concentración final de 100 mM. Tras dejarlo en nieve carbónica un tiempo variable de entre 30 minutos a 1 hora (dependiendo de la cantidad de DNA a precipitar), centrifugamos a 4° C, a 14000 rpm en minicentrífuga (Hettich Zentrifugen Mikro), durante 15 minutos. A continuación realizamos un lavado con etanol 70 % volvimos a centrifugar 5 minutos en las mismas condiciones. Tras secar bien el precipitado lo resuspendimos en el volumen deseado de agua Mili-Q.

3.4.4 Clonaje y amplificación de DNA

La digestión del DNA fue realizada siguiendo las condiciones de tampón, temperatura y concentración, recomendadas por la casa suministradora de las enzimas de restricción (New England Biolabs, Roche y MBI Fermentas).

Para generar fragmentos de DNA con extremos romos a partir de extremos protuberantes 5', el DNA fue tratado con el fragmento "klenow" de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche) durante 15 minutos a 30° C, en presencia de 0.25 mM de una mezcla igualada de dNTP. En el caso de extremos 3. protuberantes, fueron utilizadas las mismas condiciones pero en ausencia de dNTP.

La fosforilación de los extremos 5'-OH del DNA fue realizada mediante incubación con la polinucleótido quinasa del fago T4 (Fermentas) y ATP (100 µM) a 37° C durante 30 minutos.

La ligación de fragmentos de DNA fue llevada a cabo con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs), utilizando las condiciones recomendadas por la casa comercial, en un volumen final de 20 µl, ajustando la relación vector:inserto a 1:4. Las muestras fueron incubadas a 16° C durante toda la noche y 5-10 µl de estas ligaciones fueron utilizadas para transformar en 100 µl de células competentes. Para disminuir la cantidad de vector religado, éste fue incubado antes de la ligación con Fosfatasa Alcalina (New England Biolabs) a 37° C durante 1 hora.

Para la amplificación de DNA, utilizamos la DNA polimerasa de *T. aquaticus* (Perkin Elmer) o la de *T. thermophilus* (Biotools B&M), 1 unidad, con el tampón suministrado por la casa comercial, 10 % DMSO, 3 mM de MgCl₂, 0.5 mM de una mezcla igualada de dNTP y 50 pmol de cada oligonucleótido (serán especificados en cada caso), volumen final de 50 µl, amplificación en un termociclador Bio-Rad iCycler. El molde utilizado fue DNA plasmídico, DNA cromosómico o DNA procedente de una PCR previa. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel y colaboradores (Ausubel y cols., 1994).

Para aumentar la fidelidad utilizamos la DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Biotools B&M). Usamos 1 unidad del enzima en el tampón suministrado por la casa comercial. También añadimos 1ng/reacción de SSB ("single strand binding protein") para ayudar al desenrollamiento del molde de DNA (Perales y cols., 2003).

3.4.5 Secuenciación de DNA

El DNA (plasmídico o procedente de PCR) fue secuenciado de forma automática mediante una variante del método de terminación por dideoxinucleótidos (Sanger y cols., 1977) que utiliza marcadores fluorescentes para la detección de los fragmentos de DNA, "Byg Dye Terminators" ABI PR15M 377.

3.4.6 Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

La separación electroforética de fragmentos de DNA fue realizada en geles de agarosa 0.8-1.3 % (p/v) (Sigma Low EEO) en tampón TAE 1X (tabla 5). La purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa fue realizada mediante el kit PCR-Prep de Promega basado en la disolución del fragmento de agarosa y unión del DNA a una columna.

3.4.7 Generación de la librería de Interferón Gamma humano

La librería fue generada por la empresa Biométhodes utilizando el método Massive Mutagenesis® (patentes EP 1311670 B1 y US 7,202,086 B2); Saboulard y cols., 2005). Para ello los oligonucleótidos conteniendo mutaciones (concentración final 50 µM) fueron fosforilados con la polinucleótido quinasa del fago T4 y 1 mM ATP. A continuación los oligonucleótidos fosforilados (1 µl) fueron mezclados con el molde pNCK-“gen de interés” (200 ng) para iniciar una replicación de DNA de cadena sencilla (dNTP 1 mM, ATP 1 mM, MgSO₄ 4 mM, 8U polimerasa *Pfu* (Stratagene), 8U ligasa *Tth* (Stratagene), 2U polimerasa *Taq* (New England Biolabs)) en las condiciones que permitieran una unión uniforme de los oligonucleótidos. La reacción de amplificación fue realizada en 12 ciclos [(94° C, 1 min); (50° C, 2 min); (68° C, 20 min)]. La mezcla de reacción fue digerida con *DpnI* (10U) y a continuación fue dializada en agua desionizada con filtros hidrofílicos MF-Millipore (0.025 µm, Millipore). La muestra obtenida fue utilizada para electroporar células competentes de *E. coli* DH10B. El DNA extraído de las colonias resultantes de la electroporación fue utilizado para comenzar rondas sucesivas de Massive Mutagenesis®. Virtualmente todos los mutantes posibles y algunos mutantes múltiples (hasta 5 cambios en la secuencia de la proteína) están presentes en la librería, con una media de 1 mutación por molécula. Del total de la librería, 1/3 correspondían a clones de la proteína silvestre, 1/3 contenían una mutación, 1/6 eran dobles mutantes y 1/6 contenían tres o más mutaciones (Chautard y cols., 2007).

3.5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.5.1 Preparación de extractos para electroforesis

Para la obtención de proteínas totales tanto de *E. coli* como de *T. thermophilus*, las células fueron recogidas por centrifugación suave. El sedimento celular fue lavado en tampón Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM y resuspendido en tampón de ruptura de Laemmli 1X (tabla 5). Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 14000 rpm en un minicentrífuga Hettich Zentrifugen Mikro para separar los restos insolubles correspondientes a la envoltura celular. Este extracto así obtenido fue cargado directamente en geles de SDS-PAGE para su análisis.

Para separar las proteínas solubles e insolubles de ambos microorganismos, las células fueron recogidas y lavadas como en el caso anterior, posteriormente el precipitado fue resuspendido en el mismo tampón de lavado con inhibidor de proteasas (Complete Mini de Roche, una pastilla cada 10 ml de tampón), en un volumen variable entre 0.3-1 ml. La suspensión celular fue sonicada mediante 2 pulsos de 30 segundos—1 minuto a 18 μ m de amplitud en un aparato LABSONIC U (B. Braun) (potencia: máxima; intensidad: alta; frecuencia de ciclo: 0.5 s). Las células no rotas fueron eliminadas mediante centrifugación a baja velocidad (2000 rpm, Hettich Zentrifugen Mikro, 3 minutos, 4° C). La separación de la fracción proteica soluble de la insoluble fue realizada mediante centrifugación de este lisado a alta velocidad (14000 rpm, Hettich Zentrifugen Mikro, 15 minutos, 4° C). Posteriormente las fracciones fueron lavadas en el mismo tampón y fueron centrifugadas de nuevo en las mismas condiciones. La fracción insoluble fue resuspendida en un volumen igual a la fracción soluble del tampón usado. Para el análisis por SDS-PAGE se añadió tampón de Laemmli 5X a estos extractos y fueron hervidos y centrifugados como en el caso de las proteínas totales.

3.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación electroforética de proteínas fue realizada mediante geles SDS-PAGE discontinuos (10-12 %) (Laemmli y Favre, 1973). La visualización de las proteínas fue realizada mediante tinción con Azul de Coomassie (0.25 % Brilliant Blue-R en 45 % metanol, 10 % acético) y posterior lavado con 45 % metanol, 10 % acético, o bien por transferencia de las proteínas a membrana para su inmunodetección ("Western Blot").

3.5.3 Inmunodetección de proteínas (Western-blot)

Las proteínas resueltas en geles de SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de PVDF ("Immobilón-P", Millipore), prehumedecido en metanol y equilibrado en tampón de transferencia (tabla 5). La transferencia en semiseco fue efectuada en un aparato Trans-blot SD semi-dry transfer cell (Biorad), durante 1 hora a 2 mA/cm^2 en presencia de tampón de transferencia (tabla 5). Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada 3 % en tampón TBS-Tween (tabla 5) durante 1 hora e incubadas posteriormente con el anticuerpo primario diluido en TBS-Tween 1/5000 durante 1 hora. Tras un lavado de 5 minutos en TBS-Tween, fue incubado con el anticuerpo secundario diluido en TBS-Tween 1/5000 durante, al menos, 45 minutos. Tras un nuevo lavado el reconocimiento por los anticuerpos fue detectado con el sistema ECL ("Enhancer Chemi Luminiscence", Western blotting analysis system, Amersham International).

3.5.4 Medida de actividades enzimáticas *in vitro*

-Ensayo de actividad β -galactosidasa:

A partir de precipitados de células de cultivos inducidos bajo las condiciones descritas anteriormente, las células fueron sonicadas y se desarrolló el ensayo siguiendo el protocolo ya descrito (Moreno y cols., 2003), empleando ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactosidasa) como sustrato cromogénico. La reacción fue llevada a cabo a 70°C , usando un control paralelo de degradación espontánea del sustrato a esa temperatura (Miller, 1992). La actividad β -galactosidasa, medida como la cantidad necesaria para transformar $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto, fue normalizada con respecto a la masa celular para efectuar las comparaciones entre muestras del mismo ensayo.

-Ensayo de actividad nitrato reductasa:

La actividad nitrato reductasa fue medida mediante el protocolo ya descrito (Ramírez-Arcos y cols., 1998a), después de 5 minutos de incubación a 80°C con metil viológeno reducido (dicloruro de 1,1.-dimetil-4,4.-bipiridinium reducido) (Sigma) como donador de electrones y nitrato potásico (Merck) como aceptor de los mismos. Una unidad de actividad nitrato reductasa se define como la cantidad de enzima que puede producir 1 nmol/min por ml de nitrito. La concentración de nitrito fue medida mediante un método colorimétrico con N-(1-naftil)etilendiamina 0.02 % (Sigma) y con sulfanilamida 1% en HCl 2.5 N (Sigma) (Snell y Snell, 1949).

-Ensayo de actividad fosfatasa alcalina:

La actividad fosfatasa alcalina fue medida utilizando una modificación del método ya descrito (Brickman y Beckwith, 1975). Los precipitados de células de cultivos inducidos bajo las condiciones descritas anteriormente fueron lavados con Tris-HCl 100 mM pH 11.3, y resuspendidas en este mismo tampón para ser sonicadas durante 1 minuto a 18 μ m de amplitud en un aparato LABSONIC U (B. Braun) (Potencia: máximo; Intensidad: alta; Frecuencia de ciclo: 0.5 s). La fracción soluble fue separada mediante centrifugación (14.000 rpm, 20 min) y se añadió 0.5 ml de Sigma 104 (p-nitrofenil-fosfato) al 0.4 % en Tris-HCl 100 mM pH 11.3. El ensayo fue incubado a 70° C hasta la aparición de color amarillo. La reacción fue detenida añadiendo 0.2 ml de K_2HPO_4 1 M y medida la absorbancia a 420 y 550 nm. Las unidades enzimáticas fueron normalizadas con respecto a la masa celular de manera análoga a la medición de actividad β -galactosidasa.

3.5.5 Pulso proteolítico

Seguimos una modificación del método utilizado por Park y Marqusee (Park y Marqusee, 2005). Partimos de sobrenadantes de células COS-7 que sobreexpresaban IFN- γ (estirpe silvestre y mutantes), que fueron incubados durante 16 horas a 25° C en concentraciones crecientes de urea (0, 2, 4 y 6 M) en un tampón acetato sódico 100 mM (pH 5.5) con $CaCl_2$ 10 mM. Las muestras correspondientes a cada una de las concentraciones de urea fueron tratadas con Termolisina 10 μ g/ml (Sigma) durante 1 min para posteriormente detener la digestión hirviendo las muestras en presencia de tampón de carga de Laemli. El IFN- γ y los productos de la digestión fueron detectados mediante Western Blot con anticuerpos específicos (Biosource).

3.5.6 Producción de Interferón en células COS-7

La producción de Interferón fue llevada a cabo en la empresa Biométhodes. la expresión y secreción de los interferones fue llevada a cabo usando células COS-7 (ATCC CRL-1651, Invitrogen) y plásmidos pORF-IFN α , β y γ (Invivogen) conteniendo un promotor híbrido EF-1 α y una señal de poliadenilación terminadora de SV40. La transfección fue llevada a cabo en placas de 24 pocillos, usando 50 ng de DNA plasmídico y JetPEI (Polyplus Transfection), a una proporción JetPEI/DNA de 5. Tras 24 h, las células fueron lavadas y 500 μ l de medio conteniendo un contenido reducido de FBS fueron añadidos. Después de otras 48 horas, los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -20° C.

3.5.7 Factor de Termoestabilidad (TF)

Definimos TF como el número de colonias que crecen a 70° C con 20 (TF₂₀) o 40 (TF₄₀) µg/ml de kanamicina dividido entre el número de colonias que crecen a 60° C con 20 µg/ml de kanamicina (Fig. 10).

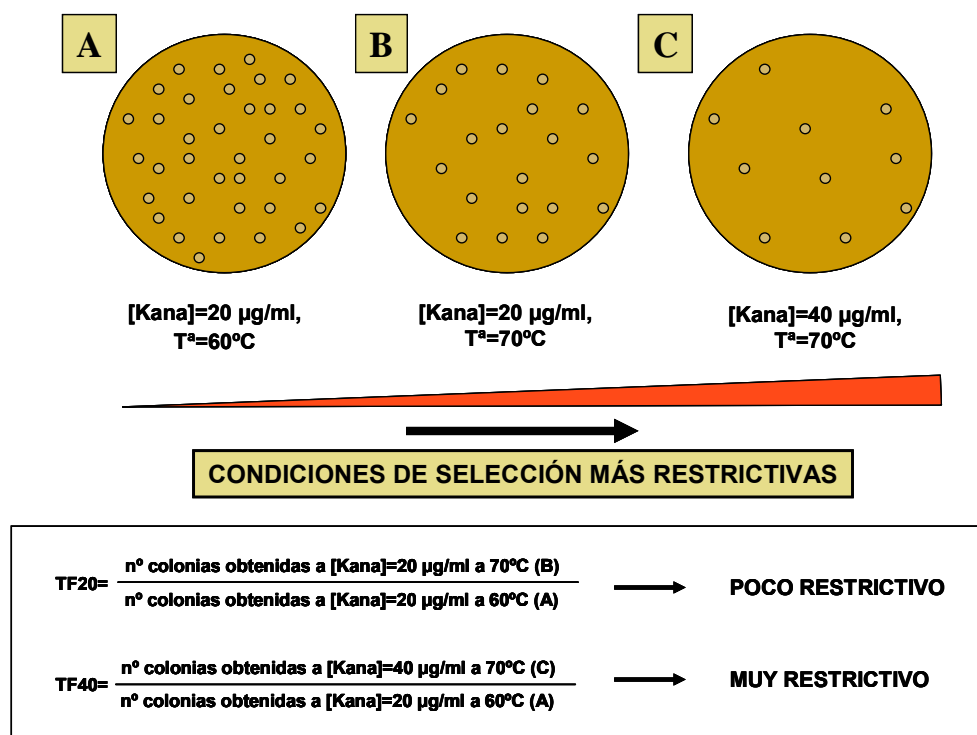


Figura 10: Cálculo del Factor de Termoestabilidad (TF).

3.6 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

3.6.1 Microscopía confocal

Las células portadoras de los plásmidos codificantes de las fusiones de interés GFP-proteína fueron crecidas en las condiciones apropiadas y fueron dispuestas en portaobjetos cubiertos con una capa fina de azarosa al 1 % en PBS. La cepa de *T. thermophilus csaB::kat* forma cuerpos multicelulares de gran tamaño (Cava y cols., 2004) que colapsan cuando se extienden sobre una superficie. Para evitar esto, 0.2 ml de muestra fueron mezcladas cuidadosamente con 0.5 ml de Gelrite (Sigma, St. Louis, USA) al 1 % (p/v) en PBS a 45° C de temperatura, en una cámara fabricada uniendo un tubo

Eppendorf cortado sobre un cubreobjetos (24 x 24 mm) . La cámara Eppendorf fue fijada en una lámina metálica, de las mismas dimensiones que un portaobjetos de microscopio normal, que a su vez estaba perforada para acomodar la cámara. Esto permite la observación en un microscopio invertido y preserva la forma e integridad de los cuerpos multicelulares.

Cuando fue requerido, los cultivos fueron tratados con paraformaldehído (concentración final 0.5 % v/v) a 70° C para prevenir cambios conformacionales en las proteínas de fusión que podrían ocurrir al enfriarse las muestras de *T. thermophilus*.

La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio confocal Zeiss META 510. Las secciones-Z fueron obtenidas con el objetivo Zeiss 63X 1.4NA y los parámetros apropiados para cumplir con el criterio Nyquist para tratamiento de imágenes. Las imágenes fueron sometidas a deconvolución lineal utilizando el software Huygens System 2.2 (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum. The Netherlands). Para el ensamblaje final de las imágenes se utilizaron los programas Adobe Photoshop e Image J (Wayne Rasband, NIH, USA).

3.7 COMPARACIÓN DE SECUENCIAS Y PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS MEDIANTE HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.

El ensamblado, comparación y traducción de secuencias fue realizado empleando el programa “Gene Jockey II” para Macintosh y el paquete DNASTar para PC.

La búsqueda de proteínas homólogas (programa BLAST, “Basic Local Alignment Search Tool”) (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania) y los alineamientos de secuencia (programa CLUSTALW) fueron realizados a través del servidor ExPASy (<http://au.expasy.org/>).

Para la predicción de estructuras fueron empleados los programas PyMol y DeepView.

La estructura cristalina de la proteína S12 y de los residuos que contactan con ella de la cadena de rRNA 16S fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Paulino Gómez-Puertas (Grupo de Modelado Molecular, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”) a partir de las estructuras cristalográficas de la subunidad ribosómica 30S por análisis geométrico comparativo. La metodología utilizada (Mendieta y Gago, 2004) mide la variación de los ángulos diédricos de los fosfatos del rRNA 16S y de los átomos Ca de

la proteína S12 en las formas abierta (Protein data Bank: 1J5E; Wimberly y cols., 2000), cerrada y unida a ARNt/ARNm (PDB: 1N32; Ogle y Ramakrishnan, 2002) y unida a estreptomicina (PDB: 1FJG; Carter y cols., 2000). Los ángulos diédricos y los valores de RMSD ("root mean square deviation") entre las estructuras fueron calculados con el paquete Insight II®. Las estadísticas de los tres pares de comparaciones fueron realizadas con SigmaPlot®.

La construcción de las estructuras 3D para los mutantes K47R y K57E de la proteína S12 fue realizada utilizando los procedimientos de modelado estándar basados en homología. Los modelos fueron realizados utilizando el servidor SWISS-MODEL (Peitsch, 1996; Guex y Peitsch, 1997; Schwede y cols., 2003). La calidad de la estructura fue chequeada utilizando WHAT-CHECK (Hoofst y cols., 1996) del programa WHAT IF (Vriend, 1990). Para obtener una optimización geométrica y corregir los choques entre átomos, la energía de la estructura obtenida fue minimizada con la implementación de GROMOS 43B1 en el programa DeepView (Guex y Peitsch, 1997).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1 - DESARROLLO DE VECTORES

4.1.1 Construcción de un plásmido con marcador de resistencia termoestable a higromicina

4.1.1.1 Construcción de pMK184

El vector de clonaje pMK18 (de Grado y cols., 1999) fue desarrollado mediante la fusión de la región mínima replicativa del plásmido pMY1 de *Thermus spp*, un cassette génico codificante de la resistencia termoestable al antibiótico Kanamicina y el origen de replicación y el sitio de clonaje múltiple de pUC18. Con este plásmido se ha conseguido una gran eficiencia de transformación, por lo que lo hemos elegido como vector para el clonaje de otros cassettes génicos de resistencia termoestable a antibióticos.

A pesar de que pMK18 contiene el sitio de clonaje múltiple de pUC18, la diana de restricción *Bam*HI no podía ser utilizada, ya que contiene otras dos dianas de restricción para esta enzima, una de ellas en el gen *repA* del origen de replicación. La eliminación de la diana de restricción *Bam*HI en *repA* se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos ABamPMKDir y ABamPMKRev (Tabla 8), modificando así la diana de restricción GGATCC por CGATCC sin modificar la secuencia de aminoácidos codificada. La segunda diana *Bam*HI fue eliminada mediante corte parcial rellenado con la enzima “Klenow” y posterior religación (Fig. 11).

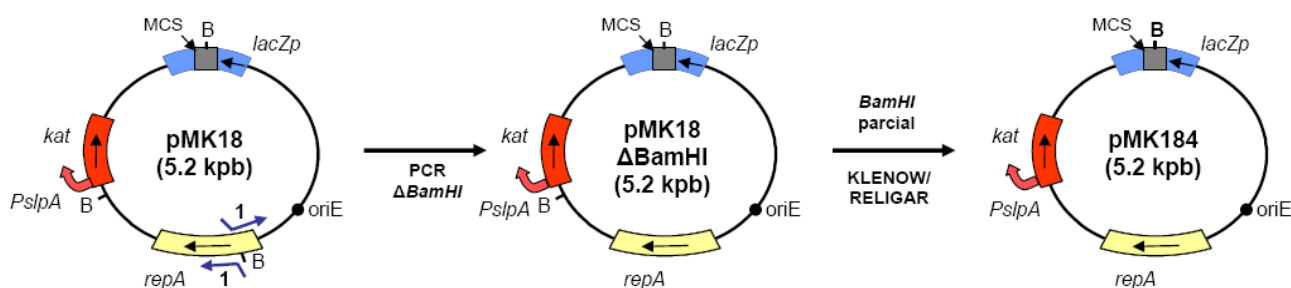


Figura 11: Construcción del plásmido pMK184. Se indica la diana de restricción *Bam*HI (B) y el Sitio de Multiclonaje (MCS). Las flechas de color azul (marcadas como 1) corresponden a los oligonucleótidos utilizados para la eliminación de la diana de restricción *Bam*HI de *repA*.

4.1.1.2 Construcción de pMH184

El Dr. Nakamura nos cedió el gen *hph5*, codificante de una higromicina B fosfotransferasa de *E. coli* termoestabilizada por evolución dirigida (Anexo I) (Nakamura y cols. 2005). Para transferirlo a pMK184 desde el plásmido pT8S-P31-HPH5, lo amplificamos con los oligonucleótidos O-P31Higro y O-HigrorevBgIII (Tabla 8); el producto de PCR obtenido fue digerido con las dianas de restricción *Bgl*III/*Nde*I y posteriormente fue clonado en pMK184, mediante sustitución del cassette de resistencia a kanamicina por el de resistencia a higromicina (Fig. 12). De esta forma el gen *hph5* quedaría bajo el control del promotor del gen *slpA* (*PslpA*).

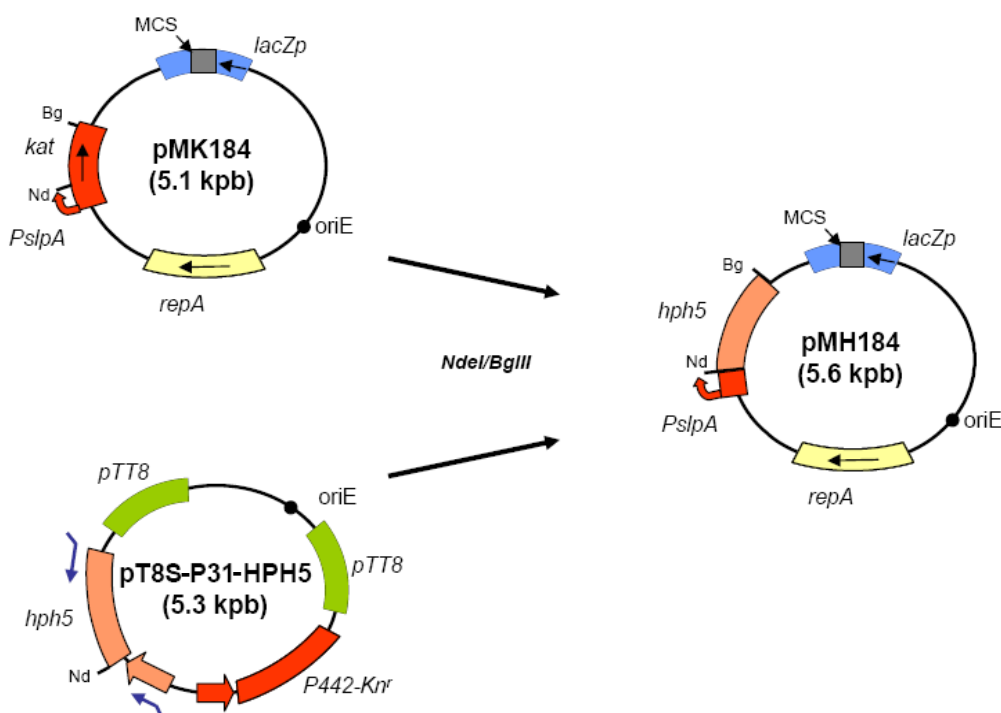


Figura 12: Construcción del plásmido pMH184. Se indican las dianas de restricción *Nde*I (Nd) y *Bgl*III (Bg).

4.1.1.3 Estabilidad y eficiencia de transformación de pMH184

-Termo-resistencia:

Datos previos (Nakamura y cols., 2005) mostraban que la máxima temperatura a la cual se puede seleccionar con higromicina empleando el plásmido pT8S-P31-HPH5 es de 65° C. Para comprobar la estabilidad frente a la temperatura de pMH184, transformamos la cepa HB27 con pMH184 y pT8S-P31-HPH5 y extendimos a la concentración de higromicina indicada (40 µg/ml) por Nakamura (Nakamura y cols., 2005). Tras la selección durante 48 h a 60, 65 y 70° C obtuvimos un número similar de

transformantes con pMH184 en todas las temperaturas ensayadas. Por el contrario, el número de transformantes obtenidos con pT8S-P31-HPH5 a 70° C fue muy inferior (Fig. 13). En los controles de transformación a 60 y 65° C se obtuvieron también algunos resistentes espontáneos, pero muy pocos a 70° C.

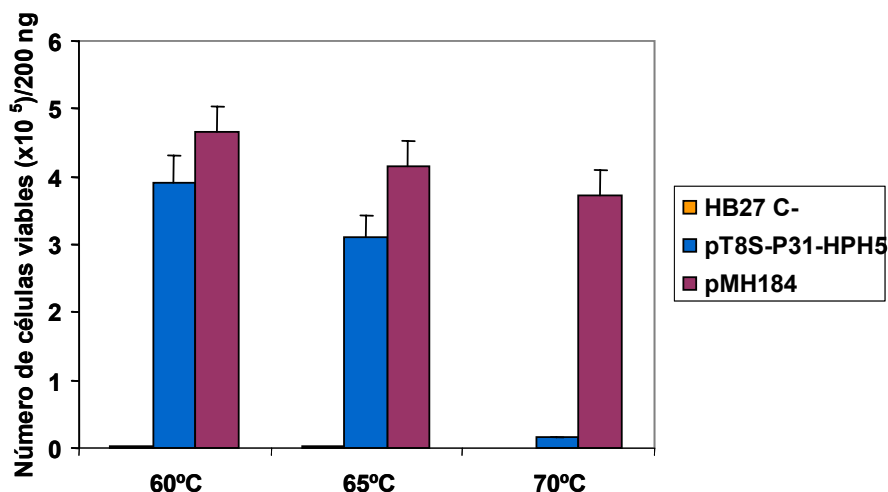


Figura 13: Termoresistencia. La gráfica indica el número de células viables obtenidas mediante la transformación de la cepa HB27 con pT8S-P31-HPH5 y pMH184 (200 ng) a diferentes temperaturas. La selección fue realizada con higromicina (40 µg/ml).

-Nivel de resistencia frente a Higromicina:

En el experimento anterior se vio que utilizando la concentración indicada por Nakamura y cols para la selección en *T. thermophilus* (40 µg/ml) (Nakamura y cols., 2005) aparecían resistentes espontáneos a higromicina. Por ello, tratamos de determinar la capacidad de pMH184 para conferir resistencia a diferentes concentraciones de antibiótico con el fin de eliminar los resistentes espontáneos. Para ello transformamos la cepa HB27 con pMH184 y pT8S-P31-HPH5 y extendimos a concentraciones crecientes de higromicina (40-80 µg/ml). Tras la selección durante 48 h a 70° C, solo se obtuvieron unos pocos transformantes con pT8S-P31-HPH5 en la concentración de higromicina más baja ensayada (40 µg/ml). Asimismo, el número de transformantes obtenido a 50 µg/ml mediante la transformación con pMH184 fue suficientemente alto como para tomarlo como concentración estándar futura para selección en *T. thermophilus* (Fig. 14).

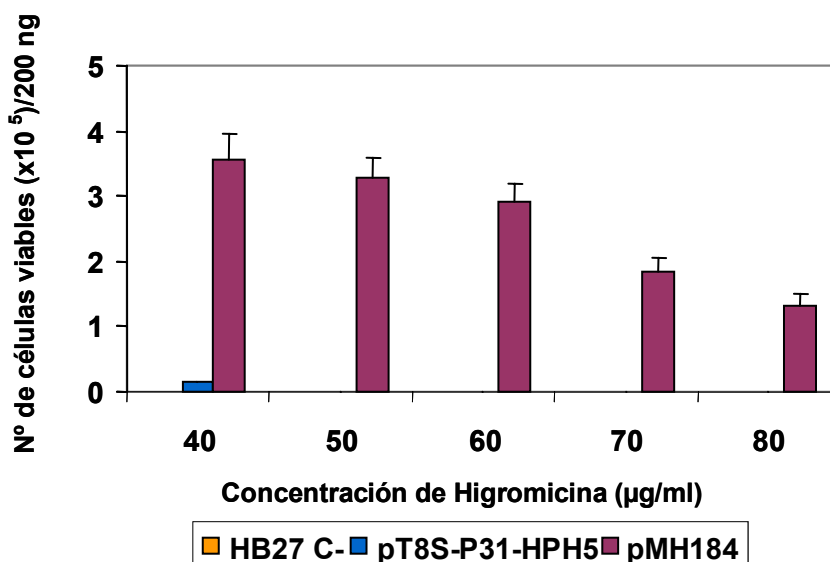


Figura 14: Nivel de resistencia a higromicina. La gráfica indica el número de células viables obtenidas mediante la transformación de la cepa HB27 con pT8S-P31-HPH5 y pMH184 (200 ng), y seleccionadas a 70° C en placas con diferentes concentraciones de higromicina (µg/ml).

-Eficiencia de transformación:

Un último ensayo que realizamos para caracterizar pMH184 fue comparar su eficiencia de transformación con respecto al plásmido del que procede (pMK184). Para ello realizamos una transformación en HB27 con idénticas cantidades de ambos plásmidos (200 ng) y seleccionamos cada uno de ellos con su correspondiente antibiótico (50 µg/ml para higromicina, 30 µg/ml para kanamicina) durante 48 h a 70° C. Los resultados muestran que se obtienen aproximadamente 3 veces más transformantes con pMK184 que con pMH184. (Fig. 15).

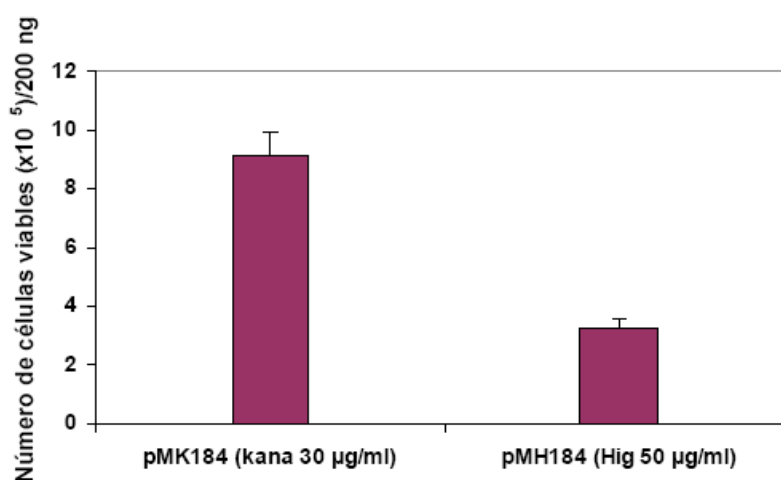


Figura 15: Eficiencia de transformación pMK/pMH. Comparación de la eficiencia de transformación en la cepa HB27 de pMK184 respecto a pMH184.

4.1.1.4 Expresión del gen *bgaA* desde pMH184

Una vez caracterizado el plásmido pMH184 quisimos comprobar si podíamos utilizarlo como herramienta para expresar genes. Para ello se construyó el derivado pMHnarbgaA, que contiene el gen *bgaA* bajo el control del promotor inducible *Pnar* insertado entre las dianas *XbaI* y *HindIII* de pMH184 (Cava y cols., 2007). Para ver su funcionalidad medimos la actividad β -galactosidasa de la cepa *T. thermophilus* HB27c (Ramírez-Arcos y cols., 1998b) transformada con pMHnarbgaA tras 4 horas de inducción del promotor *Pnar* por nitrato y anoxia (Moreno y cols., 2003). Como se puede observar (Tabla 9), se detecta una clara expresión de la actividad β -galactosidasa en las cepas transformadas con pMHnarbgaA, mientras que los controles con pMH184 sólo mostraron actividad basal.

	t = 0 h	t = 4 h
HB27 C-	11.9 \pm 1.3	14.8 \pm 1.7
HB27 pMH184	11.4 \pm 1.2	14.1 \pm 1.8
HB27 pMHnarbgaA	15.1 \pm 1.9	5850 \pm 530

Tabla 9: Actividad β -galactosidasa. Ensayo de actividad en *T. thermophilus* HB27c a 70° C. La actividad se muestra en Unidades Miller antes de comenzar la inducción (t = 0h) y transcurridas 4 horas (t = 4 h) desde su inicio.

4.1.2 Construcción de un vector para prueba de promotores

4.1.2.1 Construcción de pMHbglu

El primer paso para la construcción de un vector de estas características fue el clonaje del gen *bgl*, que codifica una β -glucosidasa (TTP0042) cedida por Eloy Ferreras, en el vector pMH184. Para ello clonamos el gen *bgl* y un fragmento de 107 pb que contenía un His-Tag y el sitio de unión al ribosoma de pET28b en pMH184 mediante digestión con *XbaI*/*HindIII*.

Una vez obtenido el vector pMH β glu tratamos de comprobar su eficiencia para detectar y ensayar la fuerza de promotores en *T. thermophilus*. Para ello clonamos por separado las regiones promotoras de los operones *nar* (790 pb) y *nqo* (451 pb) (Cava y cols., 2007) empleando las enzimas *EcoRI* y *XbaI* (Fig. 16).

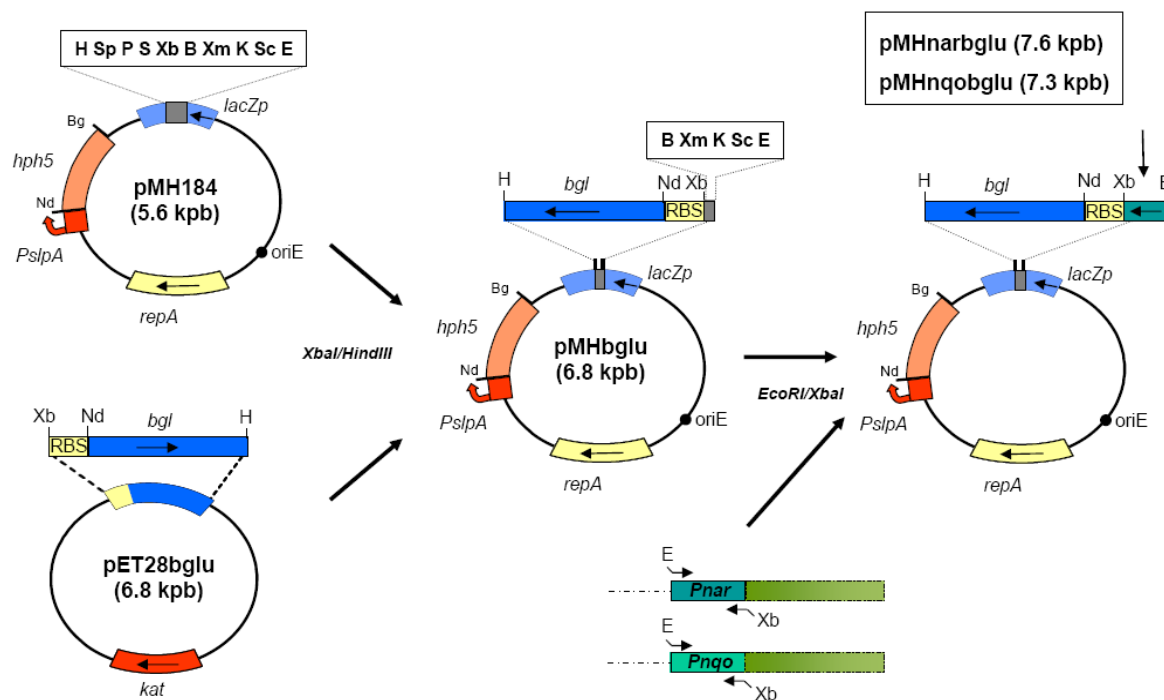


Figura 16: Construcción de pMHbglu y derivados. Se indican las dianas de restricción *NdeI* (Nd), *BglII* (Bg), *EcoRI* (E), *Scal* (Sc), *KpnI* (K), *XmaI* (Xm), *BamHI* (B), *XbaI* (Xb), *Sall* (S), *PstI* (P), *SphI* (Sp) y *HindIII* (H).

4.1.2.2 Ensayo de actividad β -glucosidasa

Una vez obtenidos los derivados pMHnrbglu y pMHnqobglu, procedimos a comprobar la validez del plásmido para el ensayo de promotores. Para ello realizamos un ensayo de inducción en la cepa HB27c (Ramírez-Arcos y cols., 1998b), previamente transformada con uno u otro derivado. Los resultados que se muestran en la Figura 17 indican que se produce actividad β -glucosidasa tanto en el vector en el que clonamos la región promotora del operón *nar* como la del *nqo*.

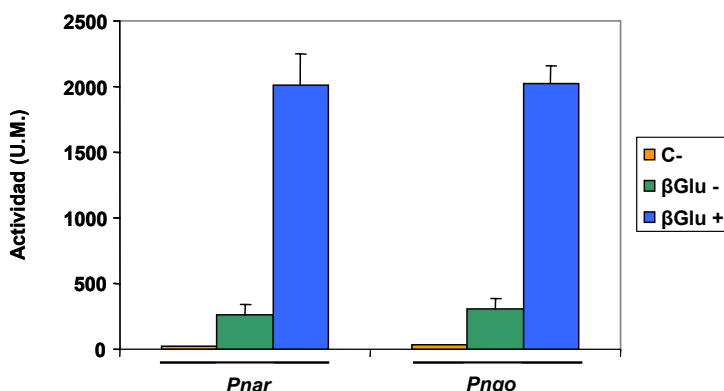


Figura 17: Actividad β -glucosidasa. Ensayo de actividad *T. thermophilus* HB27c a 70° C. La actividad se muestra en Unidades Miller. El tiempo de inducción fue de 4 horas con nitrato en anaerobiosis en el caso de los ensayos con *Pnar*, y durante toda la noche en aerobiosis para los ensayos con *Pnqo*. Los ensayos fueron realizados con un control sin transformar (C-), el plásmido pMHbglu vacío (β Glu-) y el plásmido pMHbglu con el promotor indicado en la parte inferior (β Glu+).

No obstante, es interesante destacar que existe una cierta expresión del gen testigo en ausencia del promotor, lo que indica la existencia de cierta actividad promotora críptica procedente de la región del plásmido derivado de pUC, probablemente desde el promotor *lacZp*.

CAPÍTULO 2 - DESARROLLO DE UN NUEVO MARCADOR DE SELECCIÓN TERMOESTABLE PARA *Thermus*

4.2.1 Búsqueda de nuevos marcadores de selección

Uno de los principales problemas a la hora de analizar nuevos microorganismos modelo termófilos es la escasez de genes de selección por resistencia a antibióticos. En el momento de iniciar este trabajo la única resistencia a antibióticos seleccionable en *T. thermophilus* era la kanamicina (Lasa y cols., 1992; Mather y Fee, 1992). Por ello uno de los objetivos de este proyecto era encontrar algún nuevo marcador de selección termoestable alternativo para bacterias del género *Thermus*.

El primer paso fue tratar de obtener bacterias resistentes espontáneas a estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina. Para ello realizamos la extensión de cultivos densos de la cepa HB27 sobre placas conteniendo la concentración apropiada de cada uno de los antibióticos (100 µg/ml para estreptomycin, 50 µg/ml para tetraciclina, 20 µg/ml para cloranfenicol y 100 µg/ml para ampicilina). Tras 24 horas de incubación a 70° C obtuvimos resistentes espontáneos con cada uno de los antibióticos ensayados, aunque tuvimos que desechar la tetraciclina debido al fenotipo mucoso de las colonias obtenidas que hacía difícil su manipulación. A continuación inoculamos en medio líquido con su correspondiente antibiótico una extensión de las colonias resistentes espontáneas. Tras la incubación (70° C, 24 h) tuvimos que dejar de lado la ampicilina debido a que no obtuvimos crecimiento en líquido de las colonias resistentes a dicho antibiótico. Tanto las colonias resistentes a estreptomycin como a cloranfenicol crecieron bien en medio sólido y en líquido. No obstante, y debido a problemas de estabilidad del cloranfenicol a alta temperatura, decidimos desechar la resistencia a este antibiótico para centrarnos exclusivamente en la estreptomycin.

4.2.2 Aislamiento de mutantes resistentes a estreptomycin

Dado que la resistencia a estreptomycin está frecuentemente asociada a cambios del gen *rpsL* en la proteína S12 ribosómica, diseñamos un procedimiento de selección de mutaciones en el gen codificante *rpsL* que confirieran una alta eficiencia de transformación de esta resistencia. Así, partiendo de cantidades idénticas de DNA total purificado de colonias individuales de mutantes espontáneos de *T. thermophilus* que crecieron en placas de TB con estreptomycin (100 µg/ml), transformamos cultivos de la cepa silvestre mediante competencia natural (Koyama y cols., 1986). A

4.2.3 Aislamiento de mutaciones simples

La combinación de las mutaciones K47R y K57E confiere resistencia a estreptomicina, pero desconocíamos si esa resistencia venía dada por una sola de las mutaciones o por efecto de ambas. Para comprobarlo amplificamos DNA de la estirpe *rpsL1* mediante PCR con los oligonucleótidos O-STR1 y O-STR6 (Tabla 8) para obtener la mutación K47R aislada (obteniendo un fragmento de 470 pb, desde la posición -294 a +166), y con los oligonucleótidos O-STR2 y O-STR5 (Tabla 8) para obtener la mutación K57E aislada (fragmento de 312 pb, posiciones de +143 a +445) (Fig. 19). A continuación transformamos la cepa silvestre con cantidades idénticas de los fragmentos de DNA amplificados y seleccionamos sobre placas conteniendo 100 µg/ml de estreptomicina como se ha descrito previamente. En ambos casos obtuvimos un número muy significativo de colonias respecto a los controles sin transformar. Por tanto, concluimos que ambas mutaciones producen por separado capacidad de crecimiento sobre estreptomicina.

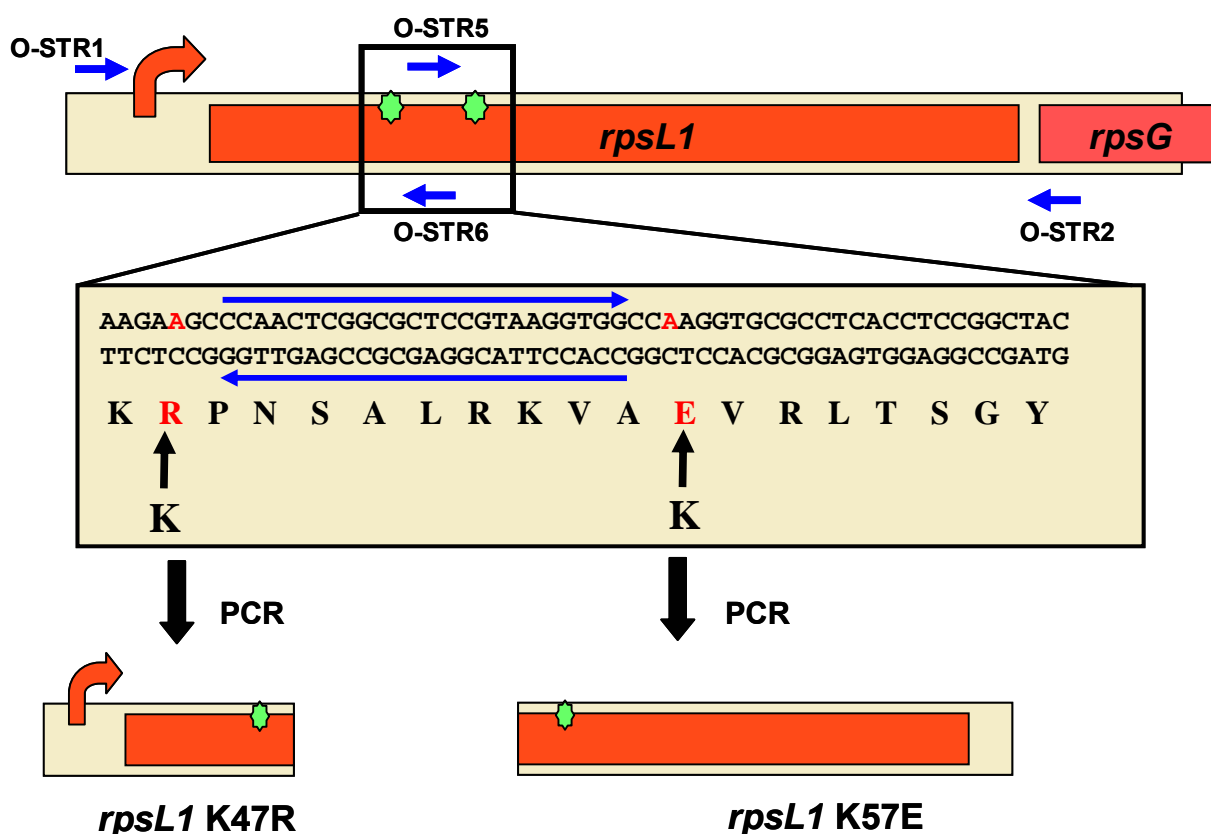


Figura 19: Esquema de la separación de las mutaciones del gen *rpsL1*. El esquema muestra el experimento para la separación de las dos mutaciones encontradas en *rpsL1*. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para el experimento (flechas de color azul). Las estrellas de color verde indican la posición aproximada de las mutaciones.

Una vez demostrado que ambas mutaciones por separado confieren capacidad de crecimiento sobre estreptomicina, procedimos a comprobar la eficiencia de la tolerancia a este antibiótico conferida por *rpsL1* (doble mutante) y por cada una de las mutaciones por separado. Para ello transformamos la cepa silvestre con cantidades idénticas de *rpsL1* y de los fragmentos de *rpsL* que contienen K47R o K57E. Realizamos la selección como se ha descrito previamente; los resultados mostraron que el número de transformantes era ligeramente superior en la transformación con *rpsL1* (K47R/K57E) que con los fragmentos portadores de las mutaciones simples (Fig. 20). A su vez, el número de transformantes con la mutación K47R fue superior al obtenido con la mutación K57E, a pesar del mayor tamaño del fragmento codificante de ésta. Estos datos demuestran que cada mutación sencilla produce por sí misma un fenotipo de resistencia aparente a la estreptomicina, siendo algo más eficiente la mutación K47R que la K57E.

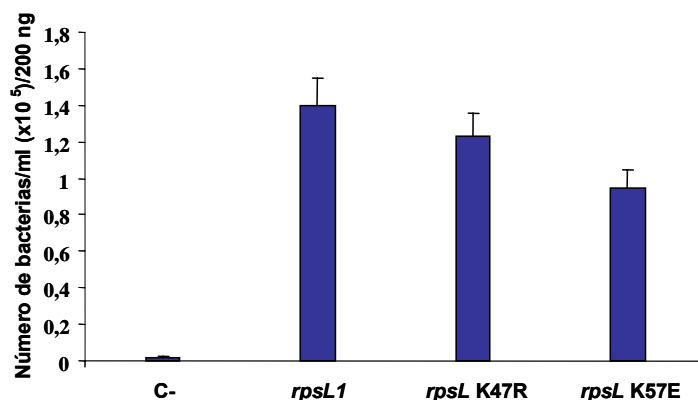


Figura 20: Eficiencia de crecimiento en estreptomicina conferida por transformación con las mutaciones de *rpsL1*. Número de resistentes a estreptomicina obtenidos mediante la transformación de la cepa HB27 con el gen *rpsL1* completo (*rpsL1*), el fragmento del gen conteniendo la mutación K47R (*rpsL* K47R) y el fragmento conteniendo la mutación K57E (*rpsL* K57E) (200 ng). La concentración de estreptomicina utilizada es 100 μ g/ml.

4.2.4 *rpsL1* confiere dependencia de estreptomicina

En trabajos anteriores (Gregory y cols., 2001) se describieron mutantes de *T. thermophilus* resistentes o dependientes de estreptomicina asociados a *rpsL*. Para comprobar si las mutaciones encontradas en *rpsL1* conferían resistencia o dependencia a estreptomicina, realizamos una extensión de células de HB27 y HB27 *rpsL1* lavadas previamente para eliminar la estreptomicina en placas de medio nutritivo TB, y a continuación colocamos discos de papel con estreptomicina e incubamos durante 24 h a 70° C. Los resultados de la Figura 21 muestran como la cepa parental crece en toda la placa excepto alrededor del disco, mientras que la cepa *rpsL1* sólo crecía en las proximidades de aquellos discos que contenían más de 10 μ g de

estreptomicina. Como control empleamos discos con kanamicina. Estos datos muestran una fuerte dependencia de estreptomicina de la cepa *rpsL1*.

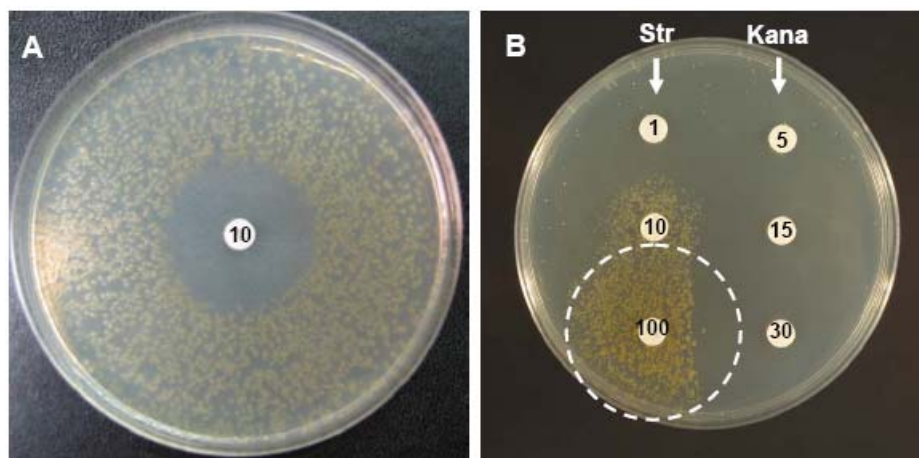


Figura 21: Dependencia de estreptomicina de la cepa *rpsL1*. (A) Efecto de la estreptomicina sobre la cepa HB27. El disco situado en el centro de la placa contiene estreptomicina. (B) Efecto de la estreptomicina (Str) y kanamicina (Kana) sobre la cepa HB27 *rpsL1*. Los discos dispuestos en la placa contienen estreptomicina o kanamicina. (A) y (B) El número en el interior del disco corresponde a los µg de antibiótico que contiene.

Para confirmar estos datos en cultivo líquido y evaluar el nivel de dependencia, así como el fenotipo conferido por los mutantes individuales, partimos de cultivos crecidos con estreptomicina (100 µg/ml) de la estirpe silvestre, del mutante *rpsL1* y de los mutantes K47R y K57E; diluimos estos cultivos (10^{-5} y 10^{-6}) y los extendimos (100 µl) en placas TB conteniendo concentraciones crecientes de estreptomicina. Tras 48 h a 70° C contamos el número de colonias de cada placa y las representamos como el porcentaje de células viables respecto a su valor máximo respectivo. Como se ve en la Figura 22, los mutantes simples K47R y K57E también muestran un claro fenotipo de dependencia, aunque requieren de una mayor concentración de antibiótico para crecer que el mutante doble K47R/K57E. De hecho, ninguno de los dos mutantes simples crece de forma apreciable a concentraciones de estreptomicina inferiores a 32 µg/ml. El experimento también revela que el mutante K47R requiere una concentración de antibiótico superior que el mutante K57E para mostrar un crecimiento efectivo: a 32 µg/ml, el mutante K47R muestra un 30 % de sus células viables respecto al máximo, que alcanza a una concentración de 128 µg/ml, comparado con el 70 % que muestra el mutante K57E. Por otro lado, los mutantes individuales crecen eficientemente incluso a 1024 µg/ml de estreptomicina, concentración en la que el doble mutante no muestra un crecimiento detectable.

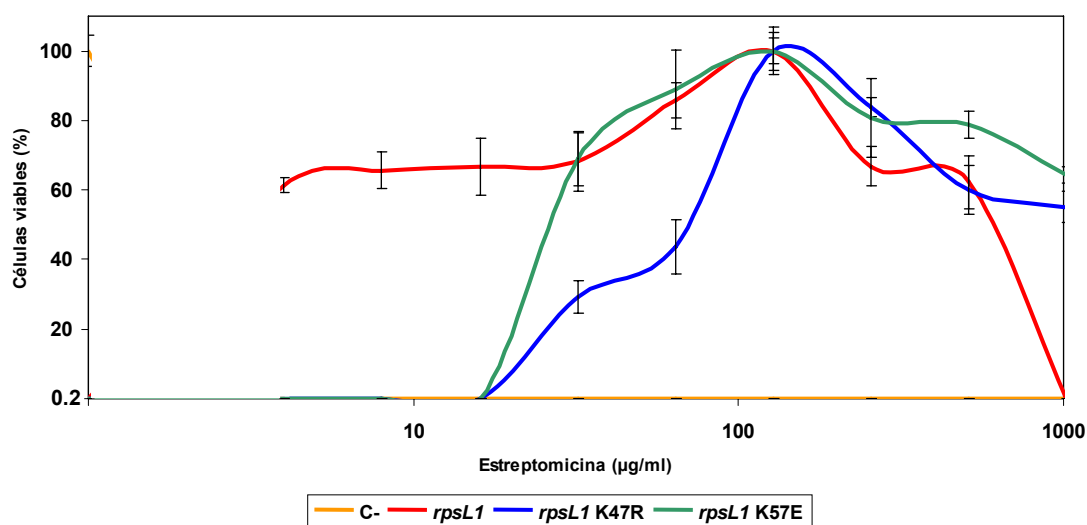


Figura 22: Dependencia a estreptomicina de *rpsL1* y sus mutantes simples. Está representado el porcentaje de células viables respecto al máximo número de colonias obtenido para cada una de las cepas ensayadas.

4.2.5 Base estructural del fenotipo de dependencia de estreptomicina

En la estructura de alta resolución de la subunidad ribosomal 30S de *T. thermophilus* unida a estreptomicina (Carter y cols., 2000), la cadena lateral interacciona con el grupo fosfato de la guanina 1491 del rRNA 16S, y constituye parte de la zona de unión de la estreptomicina (Fig. 23a). El modelado del mutante K47R (Fig. 23b) indica que el residuo mutado R (lisina) no puede localizarse en una posición equivalente y se une al mismo grupo fosfato, lo que lleva a un estado de inestabilidad en este área móvil del rRNA, como puede deducirse del análisis de torsión de los esqueletos de rRNA y proteína en las cercanías. En contraste, K57 está localizada lejos del sitio de unión de estreptomicina, e interacciona mediante un contacto iónico con un residuo fosfato de la citosina 1412 del rRNA 16S (Fig. 23a). Curiosamente, la presencia de un residuo E (ácido glutámico) en esta posición provoca una repulsión en el esqueleto 16S al nivel de esta citosina 1412 (Fig. 23c) que podría afectar al sitio de unión de estreptomicina debido a la modificación de la posición de la guanina 1491 (Fig. 23a), la cual se encuentra localizada muy cerca en el mismo lazo del rRNA. Por tanto, podría suceder que la inestabilidad en la zona de contacto entre el rRNA y la proteína S12 producida por la presencia de la estreptomicina, que mimetiza la conformación cerrada del ribosoma, fuese revertida por las mutaciones K47R y/o K57E, introduciendo un efecto repulsivo que podría “abrir” de nuevo la estructura. En este caso, la estreptomicina podría actuar como “chaperona química” restableciendo parcialmente el nuevo equilibrio entre las formas abierta y cerrada.

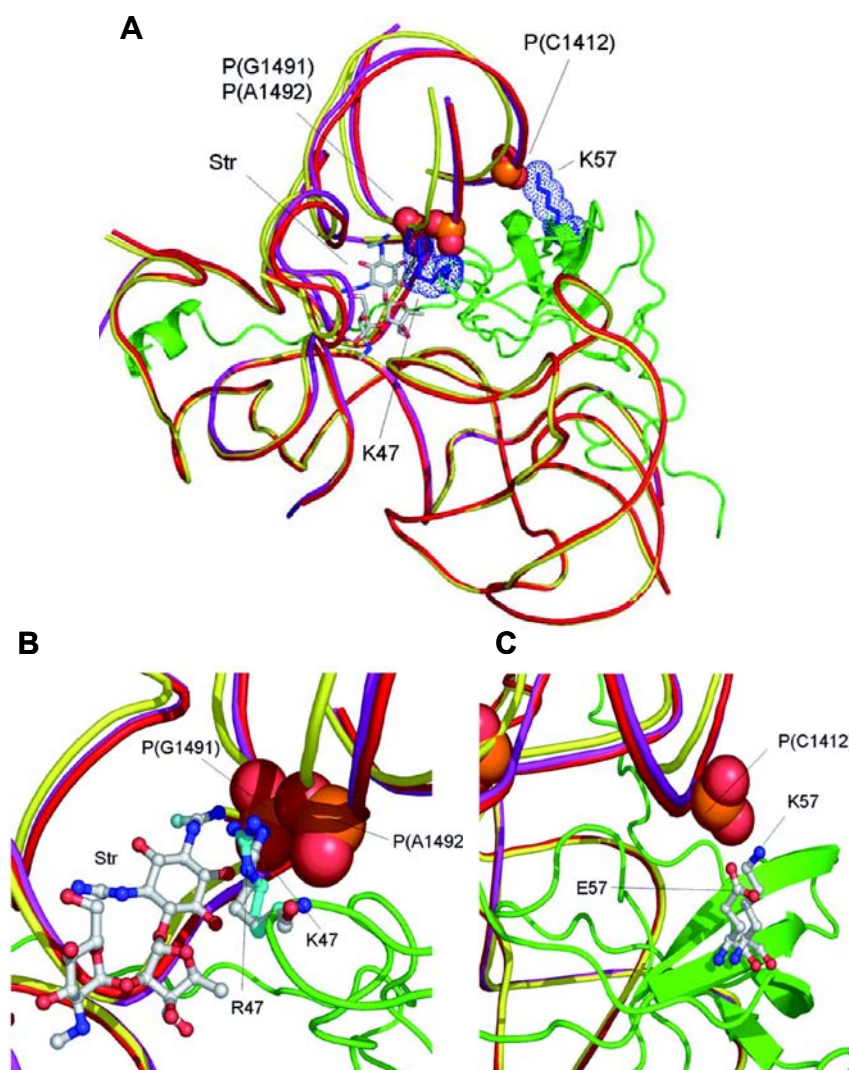


Figura 23: Comparación de las estructuras del rRNA 16S y S12. (A) Comparación estructural de la posición relativa de la proteína S12 (verde) y rRNA 16S en la forma abierta (amarilla), cerrada (roja) y unida a estreptomicina (magenta), se muestra el desplazamiento de la cadena en las proximidades de los fosfatos correspondientes a las bases G1491, A1492, así como del C1412, en contacto con K47 y K57 respectivamente. Se indica la posición de la molécula de estreptomicina (Str) en la forma unida a estreptomicina. (B) Comparación de los contactos establecidos por K47 y el R47 mutado. Se muestra el desplazamiento del esqueleto de rRNA en los tres estados (colores como en panel A). (C) E57 está localizada en contacto con el grupo fosfato de la citosina 1412, una posición inestable.

4.2.6 Utilización de *rpsL1* en vectores

Una vez comprobado que el gen *rpsL1* confería dependencia a estreptomicina, quisimos saber si era posible clonar el gen *rpsL1* (incluido su promotor) en un vector replicativo y seleccionar posteriormente con estreptomicina. Mediante PCR amplificamos el gen *rpsL1* con los oligonucleótidos O-STR1 y O-STR2 (Tabla 8). Clonamos el producto de PCR en el vector Bluescript-KS y posteriormente lo digerimos con las enzimas de restricción *EcoRI/HindIII* para su clonaje en el vector

pMK184, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (Fig. 24). Utilizamos el vector pMK184-rpsL1 obtenido para transformar la cepa HB27 mediante el método descrito con anterioridad. La selección fue realizada en placas de medio nutritivo conteniendo 30 µg/ml de kanamicina o 100 µg/ml de estreptomycin. En ambos casos obtuvimos gran cantidad de colonias (no mostrado) lo que demuestra que *rpsL1* puede ser utilizado como gen de selección de plásmidos en *T. thermophilus*.

A continuación crecimos diversas colonias en medio de cultivo líquido con su respectivo antibiótico para la extracción de DNA plasmídico. Una vez obtenido lo utilizamos para transformar la cepa silvestre según el método descrito previamente. La selección fue realizada en placas de medio nutritivo conteniendo 30 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de estreptomycin. En todos los casos encontramos colonias de las que pudo extraerse el plásmido, lo que demuestra que el vector pMK184rpsL1 replica y es posible amplificarlo tras sucesivas rondas de transformación.

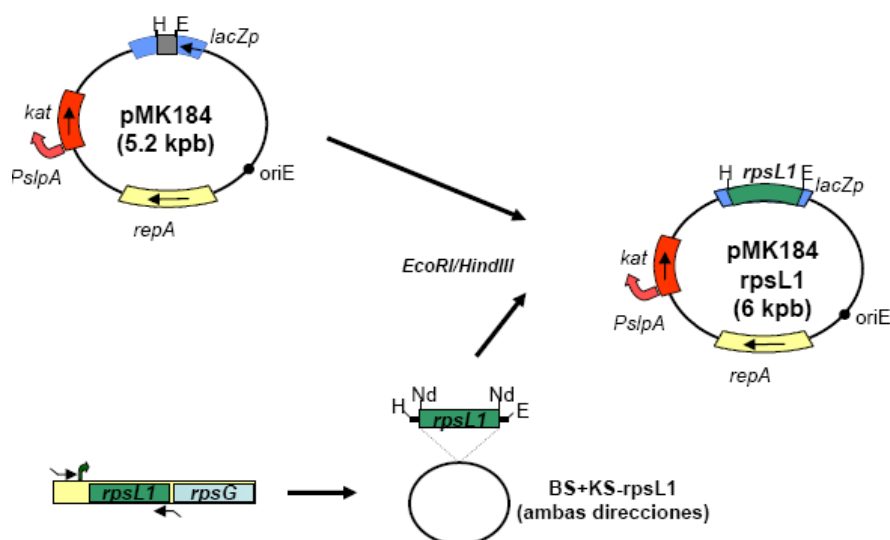


Figura 24: Construcción de pMK184rpsL1. Se indican las dianas de restricción *NdeI* (Nd), *EcoRI* (E) y *HindIII* (H).

4.2.7 Construcción de vectores integrativos basados en *rpsL1*

El gen *rpsL1* fue integrado en la diana de restricción *NdeI* de pUC18 para generar los vectores pS18a y pS18b (Fig. 25). La nomenclatura a y b indica la dirección del gen *rpsL1* en los vectores respecto al promotor *lacZp*. Los vectores resultantes son capaces de replicar en *E. coli*, donde confieren resistencia a ampicilina, pero no pueden replicar en *Thermus* spp., donde sin embargo pueden conferir dependencia de estreptomycin mediante su inserción en el cromosoma a través de los mecanismos de recombinación homóloga (ver más adelante). Sin embargo, ninguno

de estos plásmidos confería un fenotipo de resistencia o dependencia a estreptomicina en *E. coli*, como era de esperar de las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas S12 de *E. coli* y de *T. thermophilus* (Fig. 18b) (Gregory y cols., 2001).

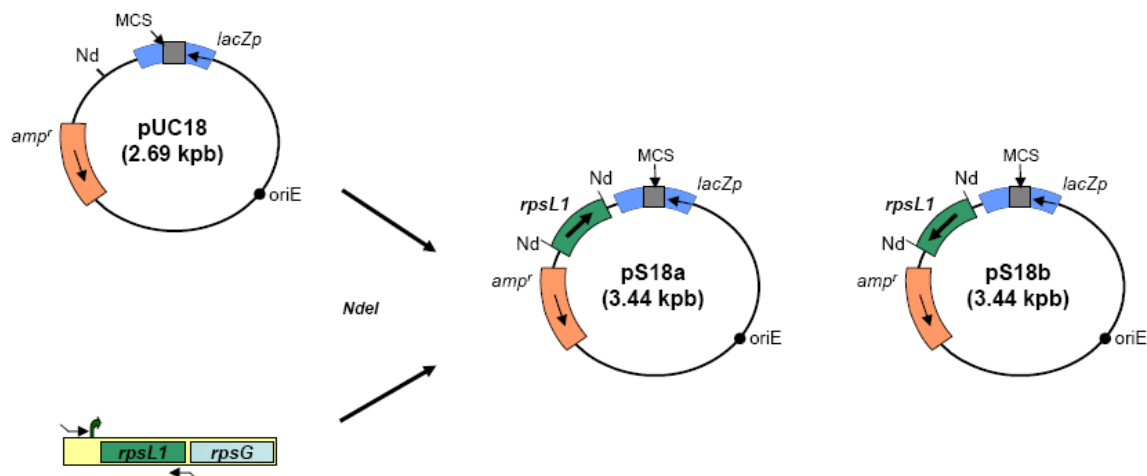


Figura 25: Construcción de pS18a y pS18b. Se indica la diana de restricción *Nde* (Nd). La nomenclatura a/b indica la dirección del gen *rpsL1* respecto a *lac*. La dirección del gen *rpsL1* fue comprobada mediante digestión y secuenciación. Se indica el Sitio de Multiclonaje (MCS).

Siguiendo el protocolo de transformación descrito antes, transformamos cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre con cantidades idénticas (200 ng) de los plásmidos pS18a y pS18b, disponiéndose también de controles no transformados. Las placas de medio nutritivo en las que realizamos la extensión de las células contenían concentraciones crecientes de estreptomicina (100, 200, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados del conteo del número de colonias obtenido tras 48 h a 70° C confirman que la transformación con los plásmidos pS18a y pS18b permite el crecimiento en placas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina de un mayor número de colonias que el de mutantes espontáneos que crecieron en las placas con células control no transformadas (Fig. 26a). En todos los casos el plásmido pS18a dio lugar a más colonias transformadas que pS18b. Estos datos sugieren que los plásmidos se habrían insertado en el cromosoma de la cepa receptora tras la transformación, capacitando a ésta para crecer en presencia de estreptomicina. A concentraciones mayores de antibiótico el número de colonias disminuye, mientras que el número de mutantes espontáneos permanece más o menos constante (frecuencia de 10^{-6} a 10^{-7}), incluso a la concentración más alta ensayada (600 $\mu\text{g/ml}$). Además, mientras que la mayoría de las colonias que crecieron en las placas control eran grandes (como las de la estirpe silvestre en ausencia de antibiótico), aquellas que crecieron tras la transformación con pS18a presentaron un número de colonias “grandes” similar en

tamaño y número a las que crecieron en las placas control, y un número mucho mayor de colonias “pequeñas” (Fig. 26b). Esta observación sugiere que la integración de pS18 en el cromosoma produce un fenotipo de crecimiento similar al mostrado por el mutante *rpsL1*. De hecho, se ensayó la capacidad de crecimiento sin estreptomicina de los dos tipos de colonias obtenidos de la transformación con pS18a. En ausencia de estreptomicina, el 95 % de las colonias grandes eran capaces de crecer (por tanto, solo resistentes, no dependientes), un porcentaje similar al mostrado por las colonias mutantes espontáneas que crecieron en placas control sin transformar. Por el contrario, todas las colonias de tamaño pequeño analizadas eran dependientes de estreptomicina.

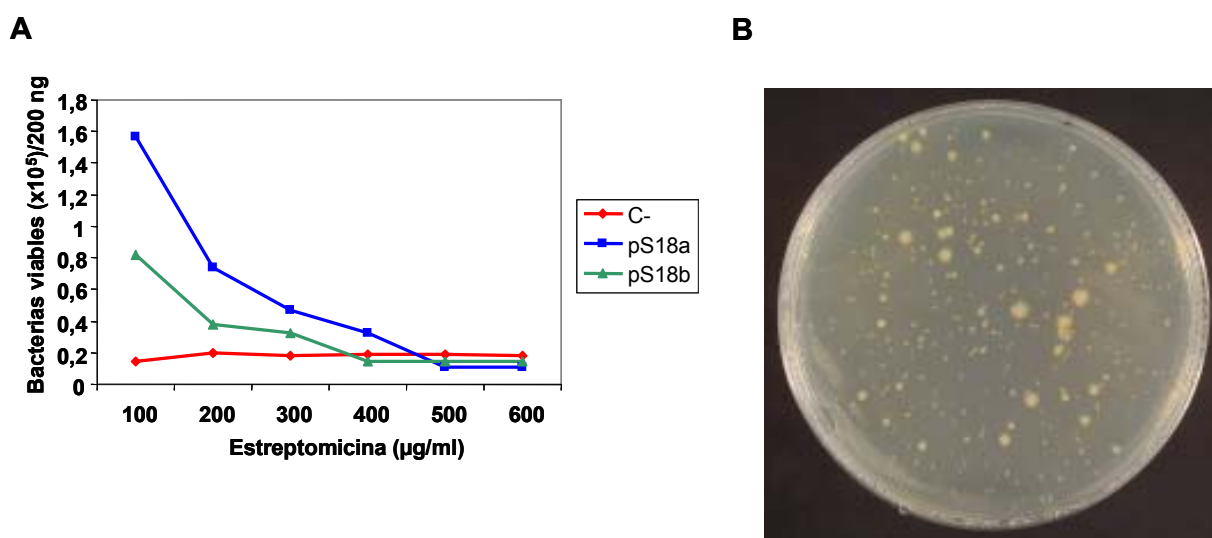


Figura 26: Número de bacterias viables. (A) Número de colonias tras la transformación con 200 ng de los plásmidos indicados que crecieron en placas conteniendo la concentración de estreptomicina indicada en el eje X. (B) Colonias de la cepa HB27 de *T. thermophilus* transformada con pS18a y seleccionada en placa de medio TB con estreptomicina (100 μg/ml). Pueden apreciarse colonias de dos tamaños diferentes, unas grandes, que corresponden a bacterias resistentes espontáneas a estreptomicina y otras pequeñas, que corresponden a bacterias transformadas con pS18a.

Los resultados descritos arriba apoyaban la idea de que el alelo *rpsL1* es insertado en el cromosoma tras la transformación con pS18a, pero no nos permitían discriminar si la secuencia del plásmido permanecía en el cromosoma tras la recombinación o era eliminada mediante una segunda recombinación. Para distinguir entre estas dos posibilidades, realizamos ensayos de amplificación por PCR de 10 colonias de pequeño tamaño (transformadas con pS18a) con los oligonucleótidos O-132pUC y O-STR8, O-STR2 y O-STR5 (Fig. 27a/b) (Tabla 8); los resultados positivos en todas las muestras analizadas (Fig. 27a) nos llevaron a concluir que el plásmido estaba presente en el cromosoma de los transformantes ensayados, ya que el oligonucleótido O-132pUC (Tabla 8) sólo hibrida con el plásmido. En consecuencia,

estas colonias tenían dos copias del gen *rpsL*, la parental y su alelo *rpsL1* (Fig. 27c), lo que nos llevó a la conclusión de que en las células transformadas con pS18a, el alelo *rpsL1* era dominante respecto al gen *rpsL* parental, dado su carácter dependiente de estreptomicina.

Posteriormente analizamos si la proteína S12 mutante se expresaba en estas colonias desde el operón *rps* (en “cis”) o desde la copia generada tras la integración del plásmido (en “trans”) (Fig. 27c). Para ello secuenciamos la copia “cis” tras su amplificación por PCR con los oligonucleótidos marcados como 1 y 3 en la Fig. 25c, y la copia “trans” tras amplificación por PCR con los oligonucleótidos marcados como 1 y 2 en la misma figura. Las dos mutaciones correspondientes a *rpsL1* fueron identificadas en la secuencia de la copia “cis” en las 10 colonias analizadas.

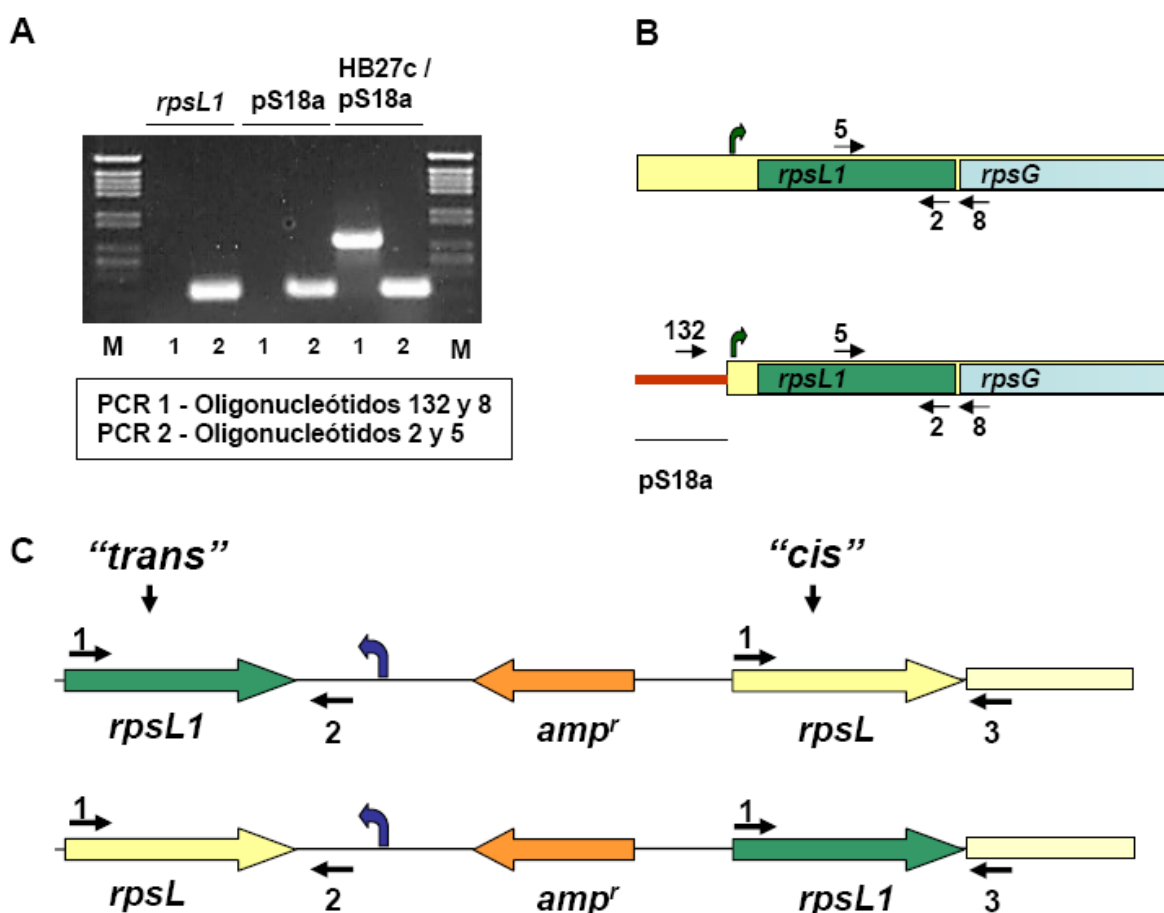


Figura 27: Inserción de pS18a en el cromosoma. (A) Ejemplo de comprobación de la inserción del plásmido pS18a dentro del cromosoma de *T. thermophilus* en uno de los clones obtenidos (HB27c pS18a). Se utilizó DNA de la estirpe *rpsL1* y el plásmido pS18a como controles. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de DNA Φ 29. (B) Esquema de la hibridación de los oligonucleótidos utilizados: O-STR2 (2), O-STR5 (5), O-STR8 (8), O-132pUC (132) (Tabla 8). En color rojo se indica la secuencia de pS18a integrada en el cromosoma. (C) Resultado posible de la integración de pS18a en el cromosoma de *T. thermophilus* mediante recombinación. El gen *rpsL* silvestre se muestra de color amarillo, el gen *rpsL1* se muestra en color verde. También se indican las posiciones aproximadas del gen *amp^r* (naranja) y de *lacZp* (flechas verticales azules). Las flechas pequeñas de color negro indican las posiciones de los oligonucleótidos O-STR1 (1), M13-rev (2) y O-STR8 (3) (Tabla 8).

4.2.8 Construcción de un vector replicativo basado en *rpsL1*

Para la obtención de un plásmido replicativo seleccionable por estreptomicina en *T. thermophilus*, amplificamos por PCR la secuencia de DNA correspondiente al origen de replicación autónoma del vector pMK184, derivado de pMK18 (de Grado y cols., 1999; de Grado y cols., 1998) con los oligonucleótidos O-Repnde2d y O-Repnder (Tabla 8). El producto de amplificación fue clonado en un derivado de pS18a poseedor de una única diana de restricción *NdeI* (derivado $\Delta NdeI$), dando lugar al vector pMS18 (Fig. 28). Éste es capaz de replicar en *E. coli*, confiriendo resistencia a ampicilina y también en *T. thermophilus*, donde genera dependencia de estreptomicina.

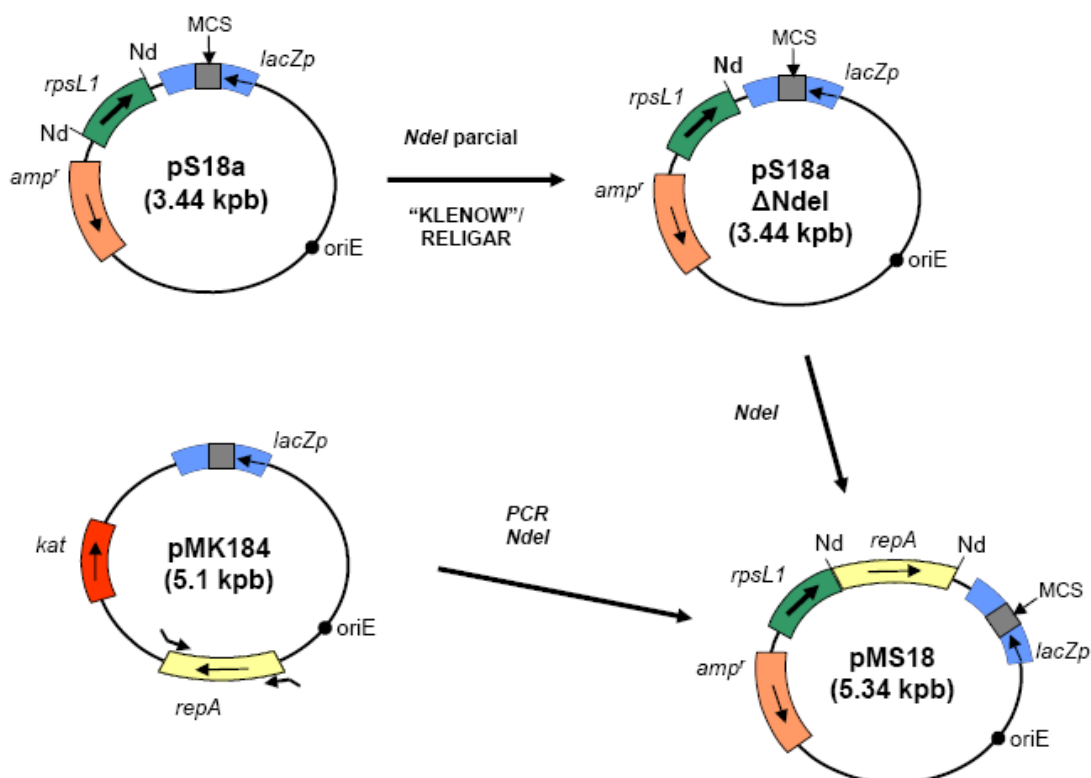


Figura 28: Construcción de pMS18. Se indica la diana de restricción *NdeI* (Nd) y el Sitio de Multiclonaje (MCS). La orientación de *repA* fue comprobada mediante digestión y secuenciación.

A continuación se compararon las características de los plásmidos pMS18 y pMK184. El número de copias de ambos era similar, como se pudo evaluar por la cantidad total de plásmido purificado de la misma cantidad de células transformadas con cada uno de ellos. La estabilidad de pMS18 fue ensayada mediante el análisis del mapa de restricción de colonias obtenidas tras 30 generaciones de crecimiento en medio TB líquido con 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina; los datos mostraron que alrededor del 90 % de los plásmidos conservaron el mismo patrón de restricción que el pMS18

original, lo que apoya la idea de que el plásmido es lo suficientemente estable como para ser utilizado como vector de clonaje.

4.2.9 Dependencia de estreptomicina conferida por pS18 y pMS18

Siguiendo el protocolo de transformación descrito antes, transformamos cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre de *T. thermophilus* con cantidades idénticas (200 ng) de los plásmidos pS18a, pS18b y pMS18, disponiéndose también de controles no transformados. Las placas de medio nutritivo en las que realizamos la extensión de las células contenían concentraciones crecientes de estreptomicina (100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/ml). Como era de esperar, la selección con pMS18 dio lugar a 5-10 veces más colonias que las obtenidas con los vectores de integración (Fig. 29a).

Cuando un número representativo de colonias (500 aproximadamente) resultantes de cada transformación fueron resuspendidas hasta una D.O.₅₅₀ de 0.5 en medio TB sin estreptomicina y extendidas posteriormente sobre placas sin el antibiótico, un número inferior a 10 colonias fue detectado tras un período de incubación de 48 h a 70° C, mientras que apareció un césped bacteriano con un control equivalente de células no transformadas. Estos resultados muestran la alta eficiencia del gen empleado en los vectores para ser seleccionado en presencia de estreptomicina y producir dependencia de este antibiótico para crecer (Fig. 29b).

Más importante aún, estos datos muestran que las células transformadas con pMS18 también adquieren un fenotipo de dependencia, a pesar de la presencia de una copia cromosómica parental del gen *rpsL*, como se comprobó mediante PCR (oligonucleótidos 1 y 3 de la Figura 25a). Por tanto, el alelo *rpsL1* es dominante sobre la copia parental silvestre cuando se expresa tanto desde un plásmido monocopia como multicopia.

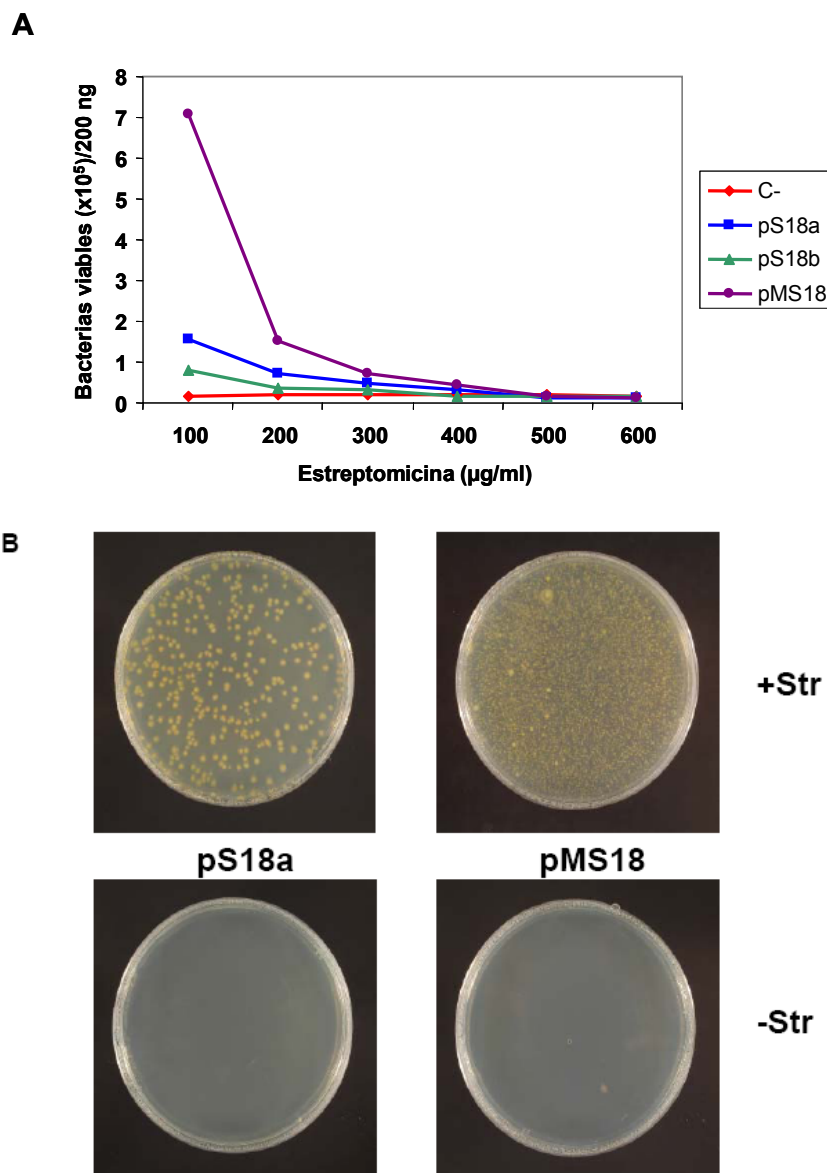


Figura 29: Viabilidad frente a estreptomicina de células transformadas con pS18a y pMS18. (A) Número de colonias que crecieron en placas conteniendo la concentración de estreptomicina indicada, tras la transformación con 200 ng de los plásmidos indicados. (B) Dependencia de estreptomicina de cepas de HB27 portadoras de pS18a o pMS18. Partiendo de suspensiones de HB27 portadoras de los plásmidos indicados, éstas fueron extendidas sobre placas con y sin estreptomicina. La concentración de estreptomicina utilizada fue de 100 μg/ml.

4.2.10 Crecimiento de mutantes dependientes de estreptomicina

Estudios anteriores mostraron que los ribosomas de mutantes resistentes a estreptomicina tienen una tasa de elongación menor durante la traducción, generando una tasa de crecimiento menor en las cepas mutantes (Ruusala y cols., 1984). Para comprobar si ese crecimiento más lento también ocurría con nuestros mutantes dependientes de estreptomicina, analizamos la curva de crecimiento de derivados de *T.*

thermophilus HB27c transformados previamente con *rpsL1*, con fragmentos de *rpsL1* conteniendo K47R o K57E (por separado), o con los plásmidos pS18a o pMS18. Partiendo de cultivos saturados, cada una de las muestras fue reinoculada en medio rico conteniendo 100 µg/ml de estreptomicina (excepto el control no dependiente de estreptomicina) a una D.O.₅₅₀ de 0.05. Los cultivos fueron incubados a 70° C con agitación (150 rpm) durante 10 h, tomando 1 ml cada hora para medir la D.O.₅₅₀. Los resultados muestran que todas las cepas transformadas crecen más lentamente que la estirpe control (Tabla 10).

Es interesante destacar que la cepa transformada con *rpsL* (K47R) crece algo más despacio que la transformada con *rpsL* (K57E), que a su vez es indistinguible de las cepas transformadas con *rpsL1* y con pS18a. Esto sugiere que la velocidad de crecimiento de estos mutantes viene determinada por la mutación K57E, mientras que la presencia de la mutación K47R no parece afectar en la velocidad de crecimiento en presencia de K57E (Tabla 10). Dicho de otra forma, la mutación K57E parece compensar parcialmente el efecto en el crecimiento mostrado por la cepa K47R.

Cepa	Tiempo de generación (min)
HB27 C-	40 ± 2
HB27 <i>rpsL1</i>	56 ± 3
HB27 <i>rpsL1</i> K47R	59 ± 2
HB27 <i>rpsL1</i> K57E	56 ± 2
HB27 pS18a	56 ± 2
HB27 pMS18	56 ± 2

Tabla 10: Tiempo de generación de las estirpes portadoras de *rpsL1* o derivados. La tabla muestra el tiempo de generación de la cepa HB27 transformada con el gen que confiere dependencia a estreptomicina (*rpsL1*), el fragmento conteniendo la mutación K47R, K57E y los plásmidos pS18a y pMS18. Todos los cultivos fueron crecidos en presencia de estreptomicina (100 µg/ml) exceptuando el control negativo (HB27 C-). Los valores obtenidos corresponden a la media de 3 ensayos independientes.

4.2.11 Utilización de pS18a para la delección forzada de genes en *T. thermophilus*

Aprovechando su carácter dominante, uno de los usos que se pretendió dar al gen de dependencia a estreptomicina era el aislamiento dirigido de mutantes de delección sin que quedara huella genética alguna de los sistemas empleados para su obtención. Como ejemplo tratamos de obtener un mutante de delección completa del gen *narC*, codificante de un citocromo C de localización periplásmica y necesario para la síntesis de la nitrato reductasa respiratoria de *T. thermophilus* (Zafra y cols., 2002).

Para ello, clonamos en pS18a un fragmento *KpnI-KpnI* de DNA de *T. thermophilus* de 977 pb que contiene las regiones flanqueantes del gen a eliminar (Olga Zafra, Tesis Doctoral). La construcción resultante, denominada pS18a Δ *narC*, fue utilizada para transformar la cepa silvestre *T. thermophilus* NAR1; aproximadamente 50 colonias fueron seleccionadas de las que crecieron en placas de medio nutritivo con estreptomicina (100 μ g/ml). Estas colonias fueron resuspendidas en medio sin estreptomicina, incubadas durante 2 h a 70° C y extendidas sobre placas de medio nutritivo sin dicho antibiótico. Bajo estas condiciones crecieron menos del 1 % de las células en comparación con las que sí lo hicieron en placas con estreptomicina. Además, estas colonias eran sensibles a estreptomicina, lo que apoyaba la idea de que podrían haber perdido el alelo *rpsL1* (Fig. 30a). El análisis de un número de estas colonias reveló que aproximadamente la mitad de ellas carecían de actividad nitrato reductasa, como era de esperar en mutantes defectivos en *narC* (Zafra y cols., 2002). La confirmación de la eliminación del gen *narC* se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos FP Pnar dir y O27-32 (Tabla 8). Todas las colonias sin actividad nitrato reductasa ensayadas revelaron que eran mutantes Δ *narC* como se demuestra por la amplificación de un fragmento de 653 pb en lugar de las 1441 pb esperadas para la cepa silvestre y su promotor (Fig. 30b).

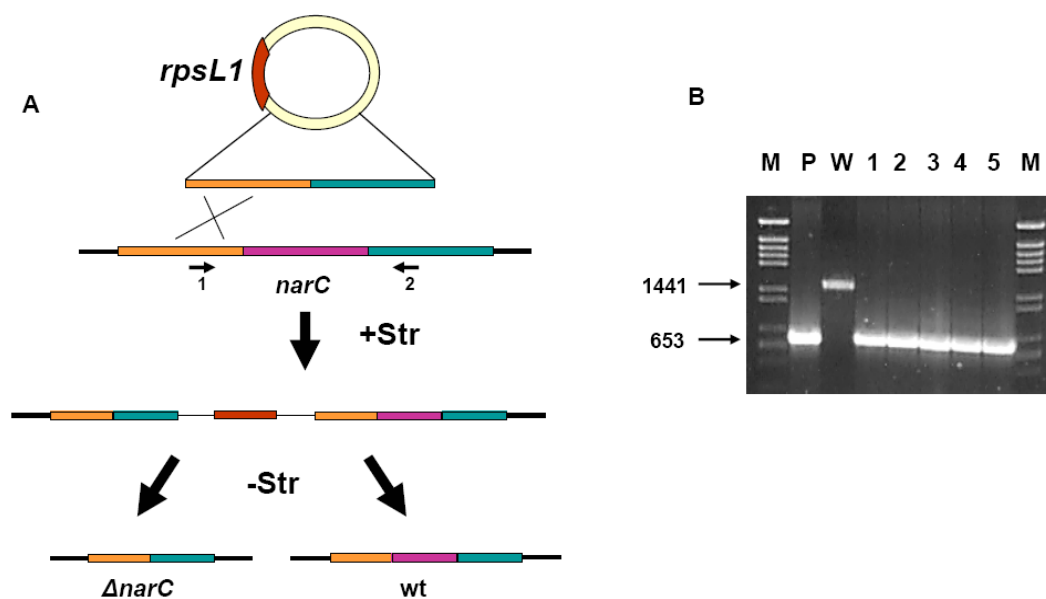


Figura 30: Utilización de *rpsL1* para la delección forzada de genes. (A) Esquema del protocolo seguido para el aislamiento de los mutantes Δ *narC*. La inserción de pS18 Δ *narC* por recombinación homóloga es seleccionada en placas con estreptomicina (+Str), y la presencia del plásmido es posteriormente contra-seleccionada en placas sin antibiótico (-Str). Las flechas marcadas 1 y 2 corresponden a los oligonucleótidos FP PnarDIR y O27-32, respectivamente (Tabla 8), usados en la amplificación por PCR mostrada en el panel B. (B) PCR con los oligonucleótidos FP PnarDIR y O27-32 (Tabla 8) de DNA total de colonias que no mostraron actividad nitrato reductasa. Los carriles P y W corresponden a la amplificación mediante PCR del plásmido pS18 Δ *narC* y del DNA total de la cepa silvestre, respectivamente. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de DNA. Los números laterales indican los tamaños en pares de bases de los productos de PCR.

El plásmido pMK184narC (el gen *narC* de pNIT3Bg fue clonado en pMK184 mediante *KpnI*) fue obtenido para realizar ensayos de complementación de la mutación de delección en el gen *narC*. Los mutantes $\Delta narC$ fueron transformados con este plásmido, y se obtuvieron colonias en placas de TB conteniendo 30 μ g/ml de kanamicina. A continuación, fueron inducidos en microaerofilia con nitrato según las condiciones descritas. Como era de esperar, las cepas $\Delta narC$ transformadas con pMK184narC presentaron actividades nitrato reductasa (producción de nitrito), mientras que los controles transformados con pMK184 no presentaron actividad.

4.2.12 Inserción en el cromosoma de una β -galactosidasa termoestable en un fondo genético silvestre

El gen *bgaA* codifica una β -galactosidasa termoestable procedente de la cepa *Thermus* spp. ATCC 27737 que se puede expresar en *T. thermophilus* HB27c desde el vector pMKE β gaA (Moreno y cols., 2003). Utilizando las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*, el gen *bgaA* unido al promotor *Pnar* inducible por nitrato y anoxia del vector pMKEbgaA fue insertado en las dianas equivalentes del plásmido pS18a y la construcción resultante, denominada pS18a-bgaA (Fig. 31), fue empleada para transformar la cepa *T. thermophilus* HB27c, seleccionando derivados dependientes de estreptomycin por inserción del plásmido en el cromosoma. Tras el proceso de inducción por nitrato y anoxia comprobamos que el 60 % de las colonias dependientes de estreptomycin obtenidas eran capaces de expresar entre 7 y 10 veces más actividad β -galactosidasa termoestable que la cepa parental transformada con el plásmido pS18a como control (Fig. 32a).

Utilizando la misma estrategia explicada en el ejemplo anterior, el gen *bgaA* y su promotor inducible por nitrato y anoxia fueron clonados en el plásmido pMS18 y la construcción resultante, denominada pMS18-bgaA (Fig. 31), fue empleada para transformar la cepa *T. thermophilus* HB27c. El 100 % de los transformantes que crecieron en placas de medio de cultivo con estreptomycin presentaron tras el proceso de inducción una actividad β -galactosidasa 15 a 20 veces superior a la de la estirpe silvestre transformada con el plásmido pMS18 como control (Fig. 32a).

4.2.13 Inserción en el cromosoma del gen *phoA* en un fondo genético *phoA::kat* resistente a kanamicina

Hasta ahora, la obtención dirigida de mutantes de inserción en *Thermus* spp. ha empleado la kanamicina como único marcador de selección, haciendo al receptor resistente a este antibiótico y limitando posibles manipulaciones ulteriores por la limitación de marcadores genéticos termoestables aplicables a alta temperatura. Al actuar la kanamicina sobre la síntesis de proteínas (al igual que el gen *rpsL*) modificando los ribosomas, existía la posibilidad de que se produjera un cierto fondo de resistencia a estreptomicina en los mutantes resistentes a la kanamicina. Para descartar dicha posibilidad, tratamos de complementar un mutante *phoA::kat*, resistente a kanamicina, con un gen *phoA* silvestre expresado desde pS18a.

El gen *phoA* codifica una fosfatasa hiperalcalina termoestable de *T. thermophilus* (Castán y cols., 2002) que fue clonada y expresada bajo el control de un promotor inducible por anoxia en el plásmido pMKEPA. Este gen y el promotor que lo controla en pMKEPA fueron clonados tanto en pS18a como en pMS18 empleando las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Las construcciones resultantes, pS18a-PA y pMS18-PA (Fig. 31) fueron empleadas después para transformar una cepa de *T. thermophilus* HB27c portadora de la mutación *phoA::kat* (este trabajo, cepa original descrita por Renata Moreno, Tesis Doctoral). Las colonias que crecieron sobre placas de medio nutritivo con estreptomicina y kanamicina fueron sometidas a ensayo de la actividad fosfatasa alcalina (FA) con el sustrato cromogénico para-nitrofenil fosfato a 80° C y pH 11.3 tras un proceso de inducción estándar por nitrato y anoxia. Los resultados, que se describen en la Fig. 32b, demuestran que ambas construcciones recuperan niveles similares de actividad FA, lo que demuestra que pueden ser incorporadas a *T. thermophilus* mediante el gen de dependencia a estreptomicina, independientemente del hecho de que la cepa receptora sea ya resistente a kanamicina. La presencia de *phoA::kat* tras el experimento de integración fue comprobada mediante PCR con los oligonucleótidos AP-1 y KAT4 (Tabla 8) para desechar la posibilidad de que algún evento de doble recombinación hubiera eliminado la mutación *phoA::kat* del cromosoma.

4.2.14 Inserción en el cromosoma del gen *narC* en un fondo genético *narC::kat* resistente a kanamicina

El gen *narC*, descrito previamente en este trabajo, fue clonado junto al promotor que lo controla tanto en pS18a como en pMS18 (Fig. 31). Las construcciones resultantes, pS18a-narC y pMS18-narC fueron empleadas después para transformar la cepa *T. thermophilus* CKN2 (Zafra y cols., 2002), portadora de la mutación *narC::kat*. A

las colonias que crecieron sobre placas con estreptomycin y kanamicina se les midió la cantidad de nitrito presente en el medio de cultivo tras un proceso de inducción estándar por nitrato y anoxia en medio líquido. La Figura 32c muestra que los transformantes con pS18a-narC generaban una concentración de nitrito 30 veces superior que la cepa parental (*narC::kat*) transformada con el plásmido pS18a como control. Los mutantes transformados con pMS18-narC presentaban una concentración de nitrito 70-90 veces superior que el control transformado con el plásmido pMS18. La presencia de *narC::kat* tras el experimento de integración con pS18a-narC fue confirmada mediante PCR con los oligonucleótidos FP Pnar Dir y KAT4 (Tabla 8).

4.2.15 Inserción en el cromosoma del gen *gfh1* en un fondo genético $\Delta gfh1::kat$ resistente a kanamicina

En las bacterias termófilas del género *Thermus*, dos factores de elongación de la transcripción (GreA y Gfh1) tienen una alta similitud de secuencia con la familia de factores de transcripción GreA/Gfh1 (Hogan y cols., 2002; Laptenko y Borukhov, 2003). En colaboración con un grupo norteamericano obtuvimos mutantes $\Delta greA::kat$ y $\Delta gfh1::kat$ (Laptenko y cols., 2006).

Para la complementación del mutante $\Delta gfh1::kat$, el gen *gfh1* fue clonado tanto en pS18a como en pMS18 empleando las dianas de restricción *EcoRI*/*Sall* desde el plásmido pUC18gfh1 (Laptenko y cols., 2006). Las construcciones resultantes, pS18a-gfh1 y pMS18-gfh1 (Fig. 31) fueron empleadas para transformar la cepa de *T. thermophilus gfh1* (Laptenko y cols., 2006). A las colonias que crecieron sobre estreptomycin les realizamos un ensayo de Western Blot para detectar la presencia de la proteína Gfh1 utilizando anticuerpos específicos contra esta proteína. Los datos de la Figura 32d muestran que prácticamente la totalidad de las colonias ensayadas recuperaron la expresión de la proteína.

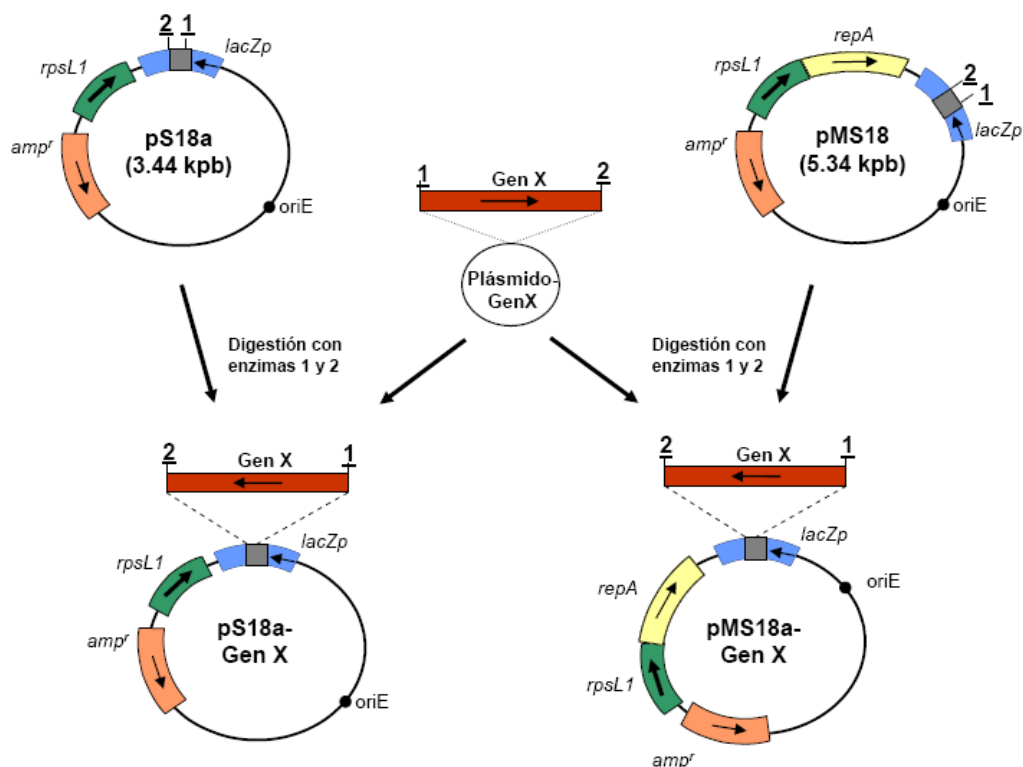


Figura 31: Construcción de plásmidos seleccionables por estreptomicina para ensayos de complementación. En la figura se muestra un clonaje a modo de ejemplo. Las dianas de restricción empleadas y específicas de cada gen elegido (Gen X), se indican como **1 / 2**: *XbaI/HindIII* (*bgaA*), *XbaI/Sall* (*phoA*), *KpnI/KpnI* (*narC*), *EcoRI/Sall* (*gfh1*). El vector denominado Plásmido-GenX representa pMKEβgaA (*bgaA*), pMKEPA (*phoA*), pNIT3Bg (*narC*) y pUC18gfh1 (*gfh1*).

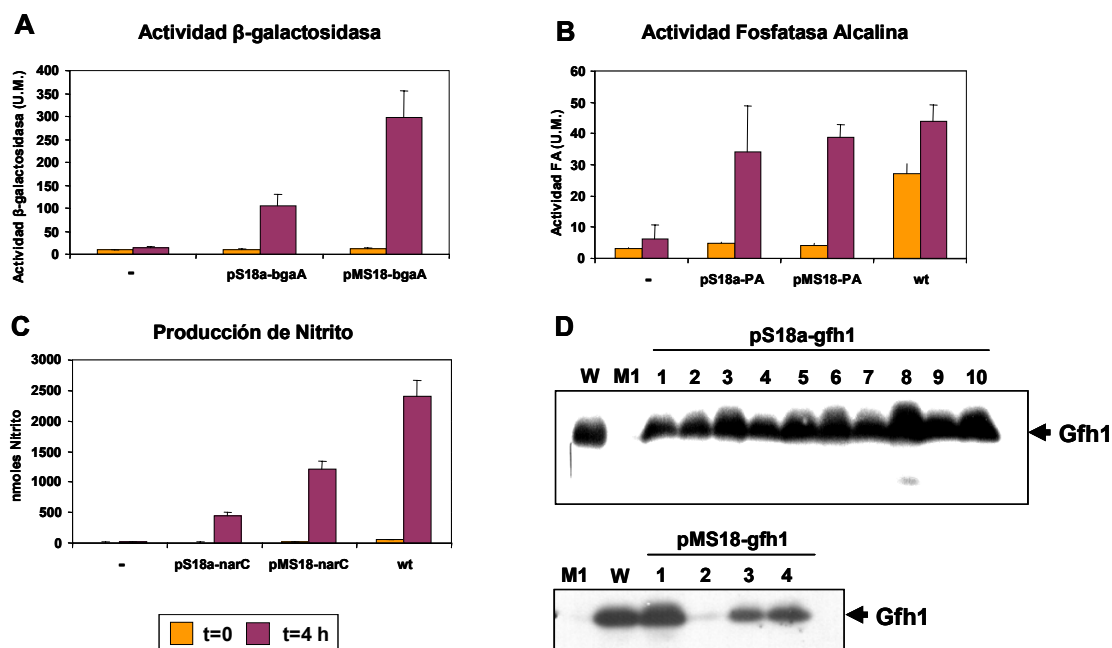


Figura 32: Ensayos de complementación. Se muestran las actividades β-galactosidasa (A), fosfatasa alcalina (B) y la producción de nitrato (C) en *T. thermophilus* HB27c, *T. thermophilus* HB27c *phoA* y *T. thermophilus* KKN2 respectivamente, transformadas o no (-) con los plásmidos indicados. En B y C se muestran los valores de la estirpe silvestre (wt) a efectos comparativos. La actividad en (A) y (B) se muestra en Unidades Miller (U.M.) y la producción de nitrato (C) en nmoles. Los tiempos de inducción corresponden al comienzo de la inducción (t=0) y transcurridas 4 horas (t=4h) desde su inicio. (D) Western Blot contra Gfh1 en colonias de un mutante *gfh1::kat* (carril M1) transformado con los plásmidos indicados. W: Estirpe silvestre.

CAPÍTULO 3 - DESARROLLO DE UN MARCADOR DE LOCALIZACIÓN TERMOESTABLE EN *T. thermophilus*

4.3.1 Construcción de vectores

La proteína sGFP es una variante de GFP con una cinética de plegamiento más rápida, que fue desarrollada por el grupo del Dr. Waldo (Pédélecq y cols., 2006), y que pensamos que podría ser utilizada como marcador termoestable de localización *in vivo* en *T. thermophilus*. El primer paso para la construcción de los vectores de fusión fue la amplificación mediante PCR del gen que codifica sGFP (cedida por el Dr. Waldo) con los oligonucleótidos NdeIMCSLINKsGFPdir y HindIIIsGFPprev que introducían un sitio de clonaje múltiple y una pequeña secuencia de unión delante de la región codificante de la sGFP, y una diana *HindIII* en 3' del gen (Tabla 8). El producto de la amplificación fue clonado en pMKEbgaA y en pMKPnqobgaA empleando las dianas de restricción *NdeI/HindIII*, para dar lugar a los vectores pMKPnarsGFP y pMKPnqosGFP respectivamente (Cava y cols., 2007b). A partir de pMKPnqosGFP, el fragmento Pnqo-sGFP fue liberado mediante digestión con las enzimas de restricción *XbaI/HindIII*, y posteriormente fue clonado en pMH184 para dar lugar a pMHPnqosGFP (Fig. 33). Este plásmido incluye el promotor *Pnqo* (450 pb) para controlar la expresión en *T. thermophilus* y el promotor *lacZp* para permitir la expresión en *E. coli* (Fig. 33). El plásmido pMHPnqoeGFP fue construido mediante el reemplazo del gen que codifica sGFP por el que codifica la forma eGFP ("enhanced" GFP), aislado por Cormack (Cormack y cols., 1996).

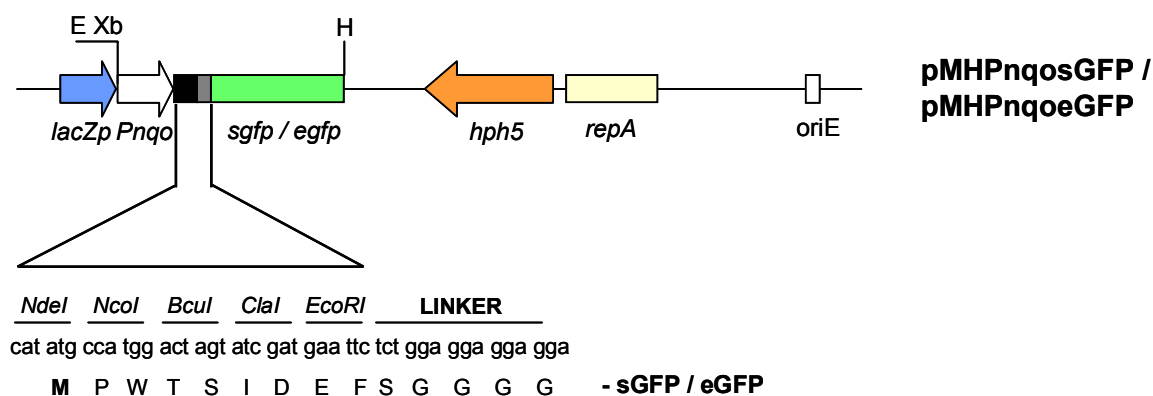


Figura 33: Plásmido para la expresión de las proteínas de fusión con sGFP. Se indican las dianas de restricción *EcoRI* (E), *XbaI* (Xb) y *HindIII* (H) y el gen de selección *hph*, junto con los orígenes de replicación para *Thermus* spp. (*repA*) y para *E. coli* (*oriE*). En la parte inferior se detalla la secuencia de clonaje múltiple y la región de unión (LINKER) preparadas para generar fusiones X-sGFP.

4.3.2 sGFP es activa *in vivo* a altas temperaturas

Los niveles de expresión de sGFP de pMHPnqosGFP en *E. coli* y *T. thermophilus* bajo diferentes condiciones fue determinado por Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra GFP (Fig. 34a). La expresión basal de sGFP desde pMHPnqosGFP en cultivos de *E. coli* crecidos a 37° C se muestra en el carril 1. Como el gen que codifica sGFP está bajo el control de *lacZp* en este plásmido, la adición de glucosa al medio dio como resultado la represión de la expresión de sGFP (Fig. 34a, carril 2). Por el contrario, la adición de IPTG indujo su expresión (Fig. 34a, carril 3). Así, la expresión de sGFP desde pMHPnqosGFP en *E. coli* puede ser regulada según sea requerida.

En *T. thermophilus*, la expresión de sGFP desde pMHPnqosGFP se encuentra bajo control de *Pnqo*, que responde al estado energético de la bacteria (Cava y cols., 2007b). Por tanto, los niveles de sGFP fueron máximos durante el crecimiento aeróbico (Fig. 34a, carril 4), se encontraron severamente disminuidos en condiciones de microaerofilia con nitrato (Fig. 34a, carril 5) o completamente eliminados en anaerobiosis (Fig. 34a, carril 6).

Estos resultados muestran que los niveles de sGFP, y probablemente de las fusiones proteína-sGFP, pueden ser reguladas tanto en *E. coli* como en *T. thermophilus* cuando son expresadas desde pMHPnqosGFP.

4.3.3 sGFP es activa a alta temperatura

Cultivos de *T. thermophilus* expresando sGFP o eGFP fueron tratados con formaldehído a 70° C para “capturar” el estado de las variantes de GFP, y posteriormente fueron tratadas para su análisis por microscopía confocal. Ambas proteínas mostraron unos niveles de expresión similares a 70° C desde pMHPnqosGFP y pMHPnqoeGFP (Cava y cols., 2007b). La Figura 34b muestra que en células que expresaron sGFP fueron detectados altos niveles de fluorescencia, mientras que no pudo detectarse señal bajo las mismas condiciones en células que expresaron eGFP (Fig. 34c). Estos datos demuestran que sGFP fue expresada y plegada correctamente en *T. thermophilus* a 70° C, mientras que la actividad de eGFP es prácticamente nula a elevadas temperaturas.

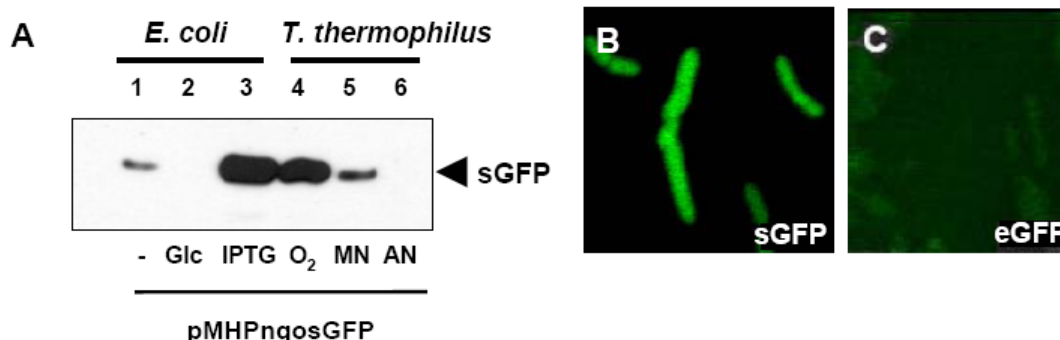


Figura 34: Expresión de sGFP a alta temperatura. (A) Western Blot para la detección de sGFP expresada desde pMHPnqo-sGFP en cultivos de *E. coli* crecidos en LB sin glucosa (-, carril 1), con glucosa (Glc, carril 2), suplementado con IPTG (IPTG, carril 3), en cultivos de *T. thermophilus* NAR1 crecidos aeróbicamente en TB (O₂, carril 4), en TB suplementado con nitrato bajo condiciones de microaerofilia (MN, carril 5) o condiciones anaeróbicas (AN, carril 6). (B/C) Imágenes de microscopía confocal, fue detectada fluorescencia en cultivos exponenciales de *T. thermophilus* portando el plásmido pMHPnqosGFP, que codifica sGFP (B). No fue detectada una fluorescencia apreciable en cultivos portando pMHPnqoeGFP, que codifica eGFP (C). Las células fueron tratadas con formaldehído a 70° C.

4.3.4 Construcción y expresión de fusiones proteína-sGFP

Para comprobar la utilidad de sGFP como una herramienta para la localización de proteínas en *T. thermophilus*, sGFP fue fusionada al extremo carboxilo terminal de proteínas que se encuentran en entornos celulares diferentes. Escogimos GroES, la subunidad pequeña de la chaperona citoplasmática GroES/GroEL (TTC1713) y PhoA, una fosfatasa hiperalcalina que se localiza en el periplasma de *T. thermophilus* (Castán y cols., 2002) (Fig. 35a). Para la construcción de las fusiones se amplificaron por PCR los genes que codifican GroES y PhoA utilizando oligonucleótidos que introducen los sitios de restricción *BcuI* y *Clal* (Tabla 8). Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con estas enzimas y clonados en los correspondientes sitios de restricción de pMHPnqosGFP.

Células de cultivos de *T. thermophilus* expresando GroES-sGFP y PhoA-sGFP desde pMHPnqosGFP fueron tratados para separar las fracciones soluble e insoluble (membrana) y la presencia de GFP fue analizada por Western Blot. Como se muestra en la Figura 35b, la masa molecular aparente de las proteínas de fusión corresponde con sus masas teóricas: 37.7 kDa para GroES-sGFP y 71.5 kDa para PhoA-sGFP. Ambas fueron detectadas en la fracción soluble, lo cual indica que las proteínas de fusión plegaron correctamente y no agregaron.

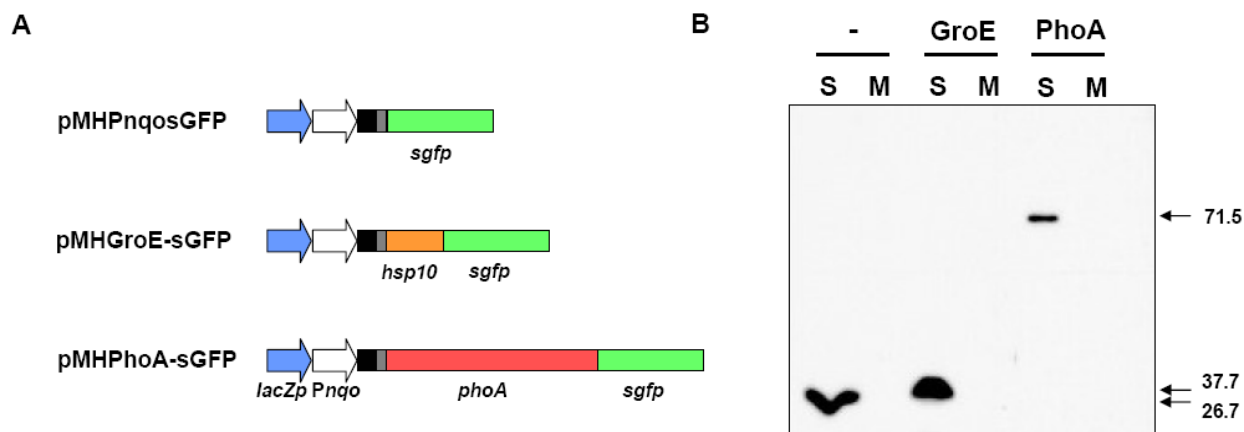


Figura 35: Construcción y detección de fusiones con sGFP. (A) Diagrama esquemático que muestra las proteínas de fusión citoplásmicas (GroES) y periplásmicas (PhoA) con sGFP y los correspondientes plásmidos de expresión utilizados. (B) Western Blot con anticuerpos específicos contra sGFP, de las proteínas de fusión GroE-sGFP y PhoA-sGFP. Se muestra el tamaño y la distribución de las proteínas de fusión entre las fracción soluble (S) y de membrana (M).

Para determinar si la proteína de fusión PhoA-sGFP era funcional, los mutantes de *T. thermophilus phoA* y *csaB* fueron transformados con el plásmido pMHPHoA-SGP. Como se ve en la Tabla 11, la expresión de la fusión PhoA-sGFP en la cepa silvestre y en los mutantes *phoA* y *csaB* producen un aumento de la actividad fosfatasa alcalina de 3 a 4 veces. El ensayo de detección de la actividad fosfatasa alcalina fue realizado como se ha descrito previamente. Estos datos demuestran que la presencia de la sGFP en posición carboxilo terminal de PhoA no interfiere con el plegamiento de esta enzima.

CEPA	-sGFP	PhoA-GFP
wt	30 ± 5	109 ± 12
<i>phoA</i>	17 ± 4	74 ± 8
<i>csaB</i>	56 ± 7	256 ± 31

Tabla 11: Actividad enzimática. Se muestra la actividad Fosfatasa Alcalina (Unidades Miller) de la cepa de *T. thermophilus* y de los mutantes *phoA* y *csaB*.

4.3.5 Localización *in vivo* de proteínas fusión con sGFP

La observación de la distribución de las proteínas fusión fue realizada mediante microscopía confocal de cultivos de *T. thermophilus* expresando las fusiones GroES- y PhoA-sGFP. Como cabía esperar de su naturaleza citoplasmática, las imágenes revelaron una fluorescencia homogénea en las células que expresaron GroES-sGFP (Fig. 36a), mientras que la fluorescencia debida a la PhoA-sGFP fue detectada distribuida en la periferia de las células de forma uniforme exceptuando en el septo (Fig. 36b).

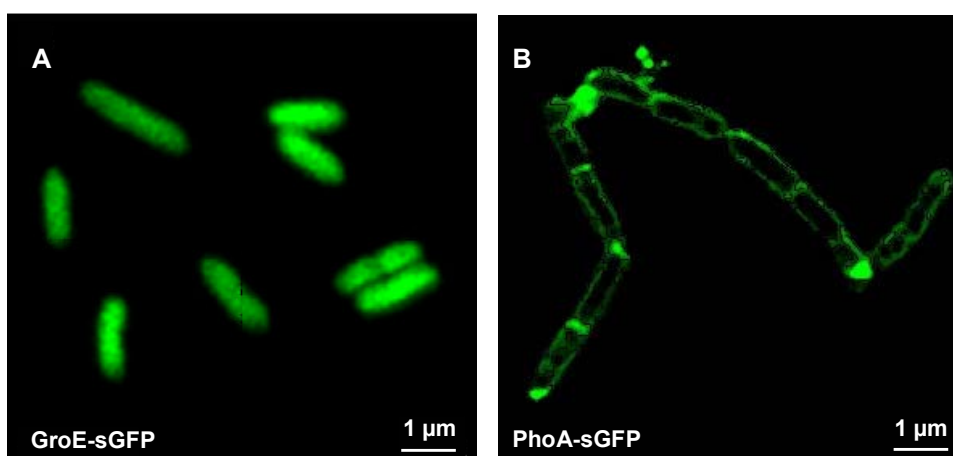


Figura 36: Localización de las proteínas de fusión con sGFP. Las imágenes muestran la cepa silvestre de *T. thermophilus* expresando GroES-sGFP (A) y PhoA-sGFP (B).

4.3.6 Expresión de PhoA-sGFP en mutantes de *T. thermophilus csaB*

El patrón de fluorescencia obtenido con la fusión PhoA-sGFP, aparte de su naturaleza soluble, sugiere que PhoA se encuentra localizada en el periplasma. En células de la estirpe silvestre *T. thermophilus* es difícil el fraccionamiento de los contenidos del periplasma debido a la unión de la capa S a los polímeros secundarios de la pared celular (SCWP, “Secondary Cell Wall Polymers”), que se encuentran unidos covalentemente al peptidoglicano. Por tanto, la fusión PhoA-sGFP fue expresada en un mutante en *csaB* que interrumpe la interacción entre la capa S y los SCWP (Cava y cols., 2004), lo cual conduce a la aparición de Cuerpos Multicelulares (MB, “Multicellular Bodies”). Los MBs son un grupo de células de *T. thermophilus* que comparten una membrana externa común que rodea un periplasma inmenso (Castán y cols., 2002). Este periplasma de mayor tamaño permite a esta cepa la producción de cantidades superiores de actividad fosfatasa alcalina que la estirpe silvestre, tanto para PhoA como para la fusión PhoA-sGFP (Tabla 11). Debido a su tamaño y a la

fragilidad de su envuelta externa, los MBs pueden ser concentrados por centrifugación y rotos mecánicamente, lo que permite el análisis directo del contenido periplásmico (Castán y cols., 2002). Como se muestra en la proyección-Z del MB mostrado en la Figura 37, la fluorescencia producida por PhoA-sGFP fue localizada en el MB y concentrada alrededor de las células en formación.

Los MBs de *T. thermophilus* que expresaron la fusión PhoA-sGFP fueron fraccionados para la detección mediante anticuerpos específicos de GFP (Fig. 38). La mayor parte de la proteína fusión PhoA-sGFP fue detectada en la fracción periplásmica, obtenida como fracción soluble tras una rotura mecánica suave de los MM (Fig. 38; carril 5), y sólo fue encontrada asociada a la fracción particulada una pequeña cantidad (Fig. 38; carril 4). Por otra parte, sGFP no fue detectada en la fracción citoplásmica obtenida de células rotas (Fig. 38; carril 3). En comparación, cuando fue expresada en células de la estirpe silvestre, PhoA-sGFP fue detectada en la fracción soluble (Fig. 38; carril 2), que incluye los contenidos citoplasmáticos y periplásmicos. En conjunto, estos datos demuestran que la proteína fusión PhoA-sGFP es transportada eficientemente en forma activa al periplasma de *T. thermophilus*.

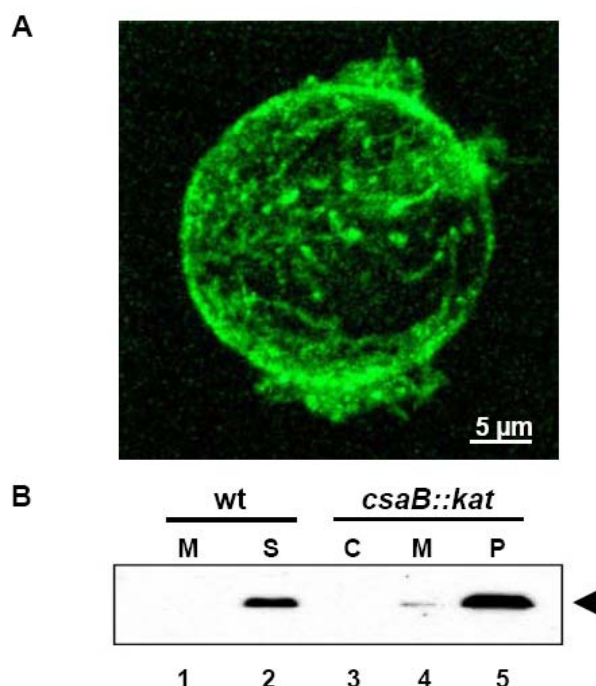


Figura 37: Expresión de PhoA-sGFP. (A) Localización de la proteína de fusión PhoA-sGFP en la cepa mutante *csaB* de *T. thermophilus*. (B) PhoA-sGFP es transportada al periplasma de *T. thermophilus*. Células de la cepa silvestre de *T. thermophilus* portando pMHPhoA-sGFP (wt) fueron cultivadas hasta fase exponencial, lisadas y fraccionadas. La presencia de la proteína de fusión PhoA-sGFP en las fracciones soluble (S, 2) o de membrana (M, 1) fue determinada mediante Western Blot. Los cultivos del mutante *csaB::kat* de *T. thermophilus* portando pMHPhoA-sGFP fueron fraccionados para separar las fracciones citoplásmica (C, 3), de membrana (M, 4) y periplásmica (P, 5).

CAPÍTULO 4 - DISEÑO DE UN NUEVO SISTEMA DE SELECCIÓN EN *Thermus thermophilus* DE PROTEÍNAS MUTANTES TERMOESTABLES

4.4.1 Modelo de termoestabilización de proteínas

Aunque los organismos termófilos constituyen una enorme fuente de enzimas termófilas, propiedades como la baja actividad específica o la falta de actividad a bajas temperaturas han propiciado la búsqueda de procedimientos para permitir la selección de enzimas hechas a medida en un proceso conocido como “evolución dirigida”.

El modelo de selección de formas estables de proteínas presentado a continuación ha sido concebido en colaboración con la empresa Biométhodes (Levry, Francia) y desarrollado conjuntamente con nuestro laboratorio. Dicho método permite la selección de mutantes termoestables de cualquier proteína en *T. thermophilus*. El método está basado en la expresión de la proteína a estabilizar como fusión N-terminal de una proteína que confiere resistencia termoestable a un antibiótico (kanamicina nucleotidiltransferasa): una enzima termosensible no plegará correctamente, interferirá en el plegamiento de la proteína de resistencia y hará al organismo sensible al antibiótico, mientras que un mutante más estable no provocará tales interferencias, y permitirá la expresión de la resistencia al antibiótico (Fig. 38).

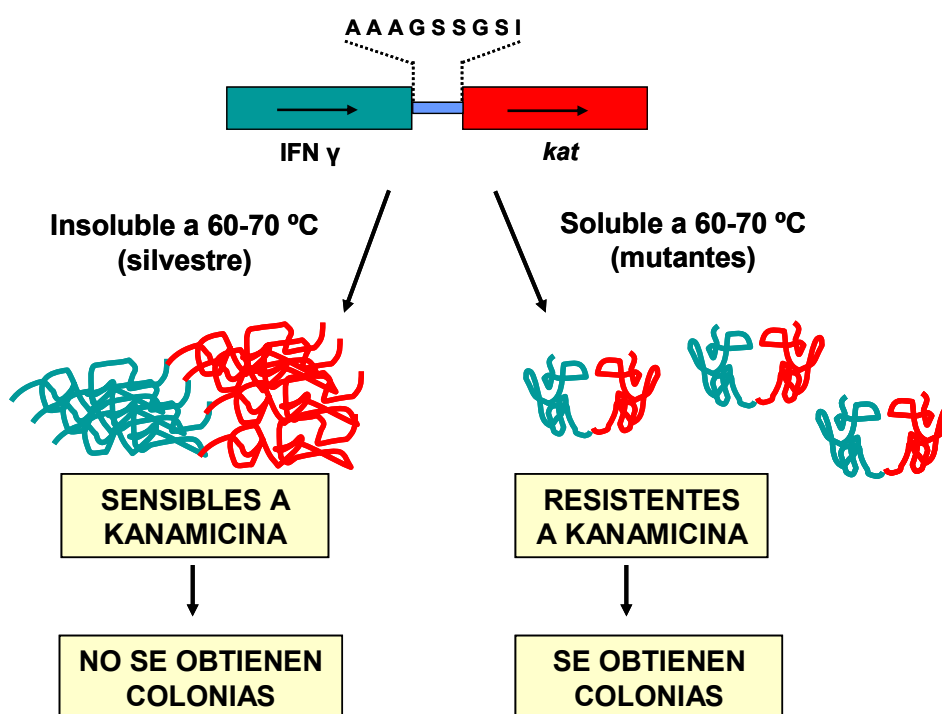


Figura 38: Esquema del modelo de termoestabilización de proteínas.

4.4.2 Construcción de vector para termoestabilización

El vector requerido para el método de termoestabilización propuesto está basado en el vector pUC18. El primer paso fue clonar el origen de replicación de pMS18 en el vector pUC18 mediante digestión con la enzima de restricción *NdeI*, obteniendo el vector pUC18Rep (Fig. 39). La orientación fue comprobada mediante secuenciación, el gen *repA* queda orientado en sentido contrario al promotor *lacZp* de pUC18.

El segundo paso fue clonar desde pKT1 el gen *kat* mediante digestión con la enzima de restricción *BamHI* en el vector pUC18Rep, obteniendo el vector pUC18RepKAT (Fig. 39). Mediante secuenciación fue comprobado que el gen *kat* queda orientado en sentido contrario a *lacZp* de pUC18Rep.

El vector final (pNCK) es un derivado de pUC18RepKAT en el que se han insertado las dianas de restricción *NcoI* y *NotI* para el clonaje de la librería de Interferón Gamma humano, además de una secuencia de 27 nucleótidos que codifica 9 aminoácidos que actuarán de unión entre el Interferón Gamma (IFN- γ) y la kanamicina nucleotidil transferasa (Chautard y cols., 2007) (Fig. 39).

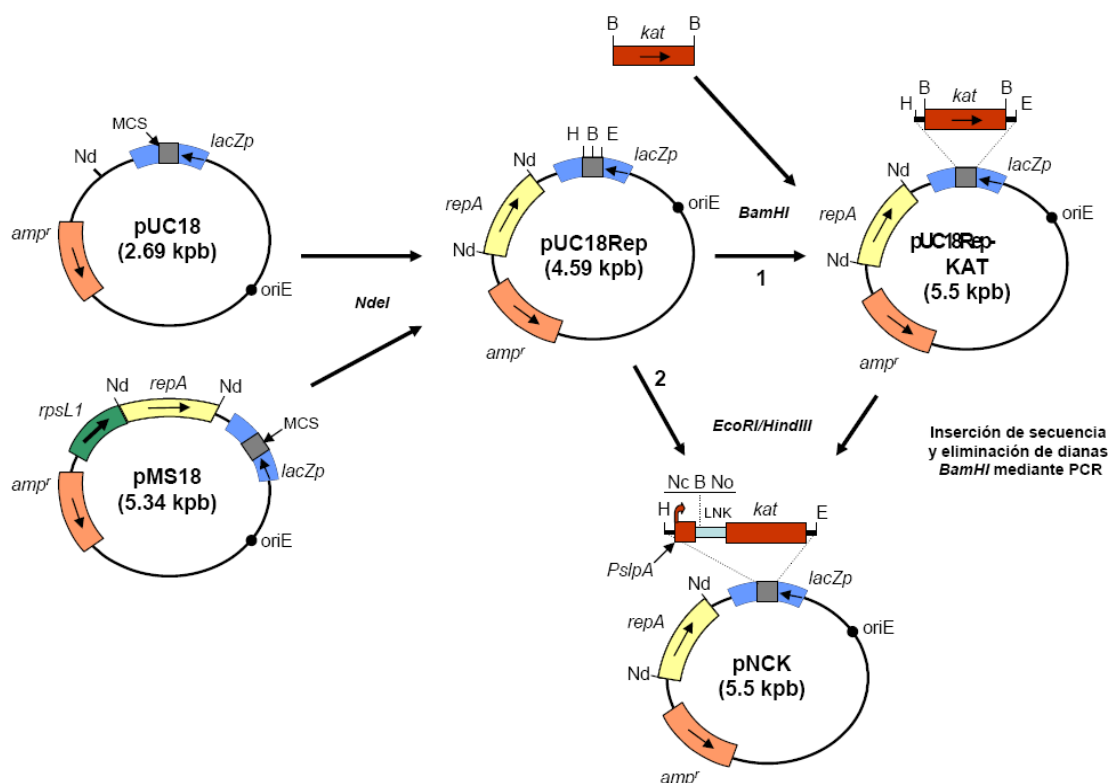


Figura 39: Construcción de pNCK. Se indican las dianas de restricción *NdeI* (Nd), *EcoRI* (E), *BamHI* (B), *HindIII* (H), *NcoI* (Nc), y *NotI* (N). Se indica el Sitio de Multiclonaje (MCS) y la secuencia de aminoácidos del "linker" (LNK). La orientación del gen *kat* fue comprobada mediante digestión y secuenciación.

Sobre este vector fue clonado el gen del Interferón Gamma humano, generando el vector pNCK-IFN- γ . Este vector fue utilizado como molde para generar la librería de Interferón Gamma mediante Massive Mutagenesis[®] (Saboulard y cols., 2005). También a partir de este vector fueron construidos varios controles para probar las condiciones óptimas de selección: IFN- γ ::K43E (denominado M1) (Lunn y cols., 1992), que codifica una proteína sensible a la temperatura; IFN- γ ::Q133L (M2) (Biométhodes), que teóricamente codifica una proteína más estable a la temperatura que la proteína silvestre; IFN- γ STOP (M3) (Biométhodes), que codifica una proteína con un codón de parada a 30 pares de bases antes del final de la secuencia del gen del IFN- γ ; IFN- γ ::E30C/S92C (M4) (Waschutza y cols., 1996), que codifica una proteína más estable a la temperatura; IFN- γ :: Δ 10 (Slodowski y cols., 1991), que codifica una proteína truncada más estable a la cual le faltan los 10 últimos aminoácidos; por último también fue construido como control un derivado de pNCK sin los 27 nucleótidos de la secuencia de unión, que fue denominado pNCK-.

4.4.3 Condiciones óptimas de selección de mutantes termoestables

Antes de realizar los ensayos para buscar mutantes termoestables en la librería generada de Interferón Gamma, había que poner a punto las condiciones de selección para el ensayo posterior. Para establecer las condiciones óptimas de selección, transformamos *T. thermophilus* HB27 con los diferentes controles (Fig. 40) y seleccionamos a concentraciones crecientes de kanamicina y a dos temperaturas (60 y 70° C). En cada una de las placas de selección se dispusieron 10 μ l de una dilución 1/10 de bacterias tras 4 h de transformación. Desechamos los controles M1 y M2 descritos anteriormente debido a la escasa información que nos aportaron en los ensayos preliminares (datos no mostrados).

Comparado con los controles pNCK (que contiene la secuencia de 9 aminoácidos) y pNCK- (sin esta secuencia), la estirpe silvestre de IFN- γ con la fusión del gen *kat* (pNCK-IFN- γ wt) era más sensible a kanamicina a ambas temperaturas, aunque aún conservaba cierta capacidad de crecimiento en placas a 60° C con concentraciones de 20-40 μ g/ml de kanamicina. Por otro lado, fusiones con mutantes termoestables de IFN- γ (M4 y Δ 10, descritos anteriormente) produjeron niveles de resistencia superiores a las de la estirpe silvestre a ambas temperaturas, mientras que la construcción de un mutante con un codón de parada era más sensible que el Interferón Gamma silvestre. Es interesante ver como en los ensayos a 60° C y una concentración de kanamicina de 80 μ g/ml, el control IFN- γ silvestre (wt) (cuadro 1, Fig.

40b) es incapaz de crecer en condiciones en las que el control termoestable $\Delta 10$ (cuadro 2, Fig. 40b), muestra crecimiento. Este mismo resultado puede verse en los ensayos a 70° C y una concentración de kanamicina de 40 $\mu\text{g/ml}$, el control IFN- γ silvestre (wt) (cuadro 3, Fig. 40b) es incapaz de crecer mientras que los mutantes termoestables M4 (cuadro 4, Fig. 40b) y $\Delta 10$ (cuadro 5, Fig. 40b) muestran crecimiento.

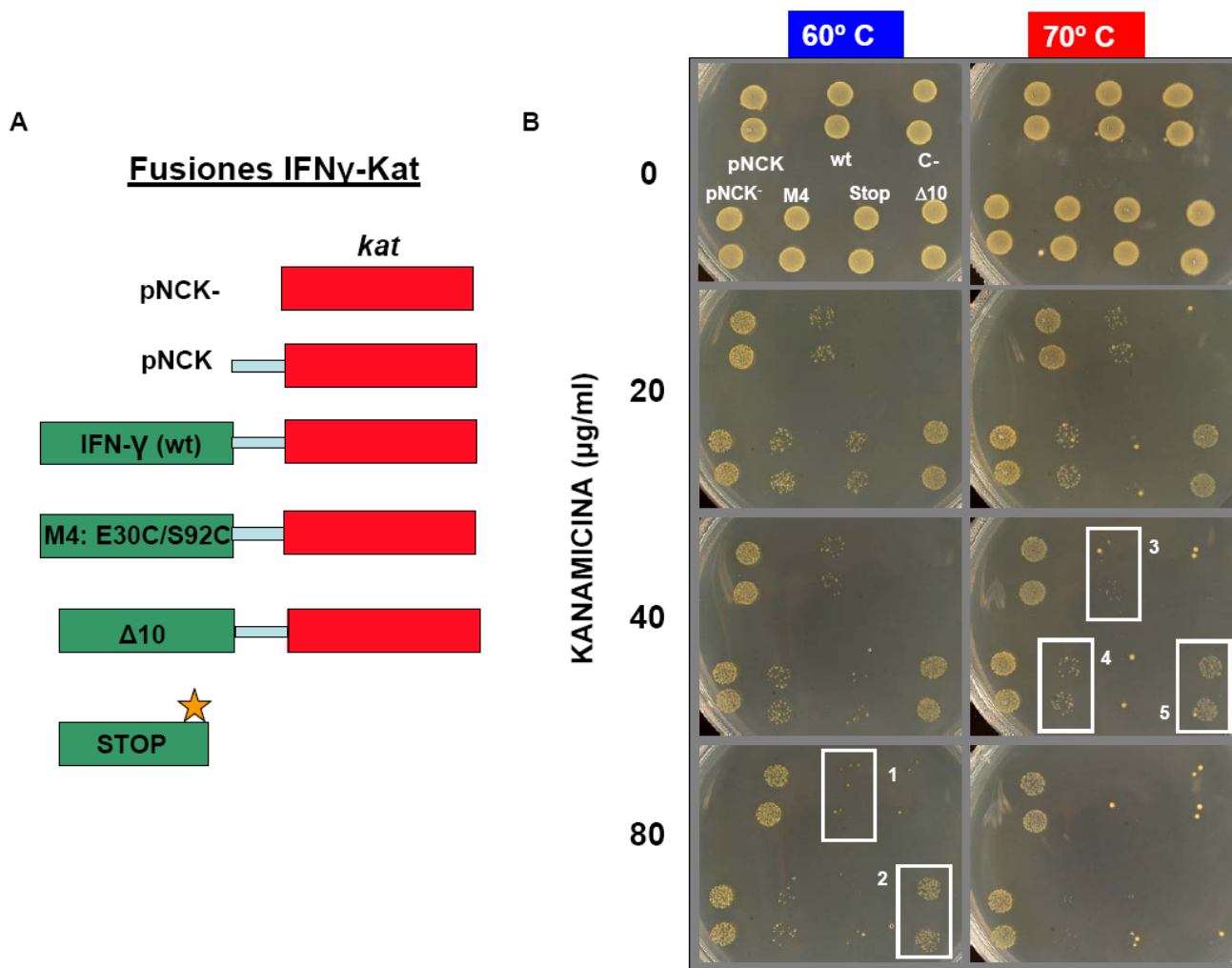


Figura 40: Funcionalidad del sistema de selección. (A) Fusiones IFN γ -*kat*. En color azul claro se indica la secuencia del "linker". La estrella de color naranja indica el codón de parada en el plásmido "Stop". (B) Ensayos de gota por duplicado (10 μl de dilución 10^{-1}) a 60 y 70° C y concentraciones crecientes de estreptomicina de la cepa silvestre sin transformar (wt) o transformada con los plásmidos indicados en el panel superior izquierdo.

Según nuestros ensayos, la termoestabilidad de las diferentes formas de Interferón Gamma se muestra como una combinación de dos parámetros: temperatura y concentración a kanamicina; en consecuencia, se confirma la hipótesis de la relación directa entre la estabilidad teórica y el nivel de resistencia a kanamicina a una

temperatura concreta. A la segunda conclusión que llegamos con estos ensayos es que bajo las circunstancias apropiadas se pueden seleccionar mutantes termoestables desde una librería de mutantes en Interferón Gamma fusionados al gen *kat* en el vector pNCK.

4.4.4 Obtención de mutantes termoestables de Interferón Gamma humano

Tras haber realizado los ensayos preliminares de selección, establecimos como criterio de selección una temperatura de 70° C y dos concentraciones de kanamicina: 20 µg/ml (condiciones poco restrictivas) y 40 µg/ml (muy restrictivas). Utilizamos una preparación de DNA de la librería de Interferón Gamma para transformar mediante electroporación la cepa HB27 de *T. thermophilus*. Tras una incubación de 4 horas, extendimos las bacterias en placas de medio rico conteniendo kanamicina a 20 y 40 µg/ml, y las incubamos a 70° C durante 48 h.

A partir de aproximadamente 10⁶ transformantes en las placas que contenían 20 µg/ml de kanamicina obtuvimos cerca de 200 colonias, mientras que en las placas que contenían 40 µg/ml de kanamicina obtuvimos 35 colonias. El vector conteniendo la fusión de Interferón Gamma silvestre fue utilizado como control de transformación para asegurar la existencia de presión selectiva; asimismo el control positivo pNCK fue utilizado para establecer la eficiencia de la transformación.

Los plásmidos obtenidos fueron amplificados y utilizados para la transformación de *E. coli* para su posterior estudio, y de éstos fueron elegidos 120 clones. Aproximadamente el 80 % de los plásmidos aislados a partir de los clones seleccionados presentaban un perfil normal en geles de agarosa, así que 96 de ellos fueron secuenciados. De estos, un 10 % presentaban un codón de parada al principio de la secuencia del interferón o la eliminación de 1-2 pb (siempre cerca del extremo 5'), un fenómeno ya descrito con anterioridad (Cabantous y cols., 2005). Los clones pertenecientes a la estirpe silvestre también fueron descartados y otros muchos estaban repetidos, dejando un total de 33 mutantes, de los que se ensayaron 31. De estos, 17 presentaban 1 mutación, 9 contenían 2 mutaciones, 2 tenían 3 mutaciones y otros 3 acumulaban 5 mutaciones.

4.4.5 Factor de Termoestabilidad (TF) de los mutantes de Interferón Gamma humano

La termoestabilidad de los 31 clones fue ensayada de nuevo en *T. thermophilus* mediante la determinación del “Factor de Termoestabilidad” (TF), descrito en Materiales y Métodos (Fig. 9).

Cada uno de los clones ensayados fue utilizado para transformar la cepa HB27 de *T. thermophilus*; tras 4 h de incubación fueron extendidos 100 µl de la transformación en placas de medio rico con 20 o 40 µg/ml de kanamicina y fueron incubados a 60 o 70° C durante 48 h, según lo expuesto anteriormente. Los datos de la Tabla 12 muestran los TF de los clones, algunos de ellos muestran una termoestabilidad aparente superior a la de algunos mutantes descritos previamente, como el M4 (Waschutz y cols., 1996) o Δ10 (Slodowski y cols., 1991). Resulta sorprendente también la presencia de algunos clones (4) con estabilidad aparentemente similar o inferior a la de la cepa silvestre.

	CLON (MUTACIÓN)	Nº MUT.	TF 20	TF 40
Controles	pNCK-IFN γ		0.03 ± 0.02	<0.001
	pNCK-IFN Δ10		0.36 ± 0.03	0.12 ± 0.01
	pNCK-IFN::E30C/S92C	2	0.57 ± 0.07	0.29 ± 0.02
	pNCK-IFN Stop		<0.001	<0.001
Seleccionadas en Kan40	C21W	1	0.31 ± 0.04	0.004 ± 0.007
	R162E	1	0.49 ± 0.064	0.046 ± 0.034
	R163T	1	0.2 ± 0.011	0.015 ± 0.02
	C21G, F159C	2	0.156 ± 0.024	<0.001
	M100N, T119Y	2	0.108 ± 0.049	0.037 ± 0.03
	A147E, R162D	2	0.055 ± 0.013	0.016 ± 0.013
Seleccionadas en Kan20	D25H	1	<0.001	<0.001
	D25V	1	0.011 ± 0.002	<0.001
	V28C	1	0.07 ± 0.017	0.008 ± 0.012
	W59F	1	0.025 ± 0.013	<0.001
	S63R	1	0.06 ± 0.028	0.023 ± 0.015
	E98K	1	0.49 ± 0.054	0.249 ± 0.034
	S165V	1	0.399 ± 0.145	0.011 ± 0.006
	Y22F	1	0.084 ± 0.015	0.037 ± 0.049
	Y22W	1	0.298 ± 0.131	0.043 ± 0.045
	C21E	1	0.018 ± 0.013	<0.001
	N120M	1	0.015 ± 0.01	<0.001
	M68L	1	0.298 ± 0.123	0.039 ± 0.027
	L51F	1	0.164 ± 0.09	0.001 ± 0.002
	T124R	1	0.172 ± 0.03	<0.001
	C21Q, Q90H	2	0.026 ± 0.036	<0.001
	L126H, M157W	2	0.126 ± 0.04	<0.001
	Y22D, S122H	2	0.436 ± 0.1	0.39 ± 0.074
	P26D, S122P	2	0.344 ± 0.04	0.189 ± 0.163
	Y76D, K131I	2	0.159 ± 0.07	0.027 ± 0.023
	R162Q, A164E	2	0.58 ± 0.07	<0.001
	Y22S, L158W, R163G	3	0.283 ± 0.06	0.044 ± 0.01
	T50Y, Y121T, M140P	3	0.474 ± 0.046	0.105 ± 0.054
	Y22T, K109C, T119P, Q147F, R163L	5	0.064 ± 0.038	0.001 ± 0.002
	C21E, V45G, R165I, Q71C, I89F	5	0.153 ± 0.006	0.004 ± 0.003
	Y22L, M68F, D86Q, M100W, T119R	5	0.277 ± 0.094	0.066 ± 0.049

Tabla 12: Factor de Termoestabilidad. Se muestra la TF de los clones seleccionados y de los controles de IFN-γ. Se indican el número de mutaciones de cada uno de los clones. La concentración de kanamicina (kana) está indicada en µg/ml.

Además de los clones originales aislados de *T. thermophilus*, fueron generados mutantes simples de algunos de los mutantes con 2 y 3 cambios para determinar el efecto en la termoestabilidad de cada una de las mutaciones individuales (Biométhodes). El Factor de Termoestabilidad de los mutantes simples generados se muestra en la Tabla 13.

CLON (MUTACIÓN)	N° MUT.	TF 20	TF 40
pNCK-IFN γ		0.03 ± 0.02	<0.001
pNCK-IFN $\Delta 10$		0.36 ± 0.03	0.12 ± 0.01
pNCK-IFN::E30C/S92C	2	0.57 ± 0.07	0.29 ± 0.02
pNCK-IFN Stop		<0.001	<0.001
C21G, F159C	2	0.156 ± 0.024	<0.001
C21G	1	0.108 ± 0.008	<0.001
F159C	1	0.156 ± 0.049	0.053 ± 0.045
M100N, T119Y	2	0.108 ± 0.049	0.037 ± 0.03
M100N	1	0.065 ± 0.044	0.023 ± 0.025
T119Y	1	0.088 ± 0.046	0.028 ± 0.02
R162Q, A164E	2	0.58 ± 0.07	<0.001
R162Q	1	0.024 ± 0.015	<0.001
A164E	1	0.857 ± 0.04	0.483 ± 0.005
T50Y, Y121T, M140P	3	0.474 ± 0.046	0.105 ± 0.054
T50Y	1	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.004
Y121T	1	0.186 ± 0.055	0.014 ± 0.012
M140P	1	0.272 ± 0.081	0.224 ± 0.077
Y22D, S122H	2	0.436 ± 0.1	0.39 ± 0.074
Y22D	1	0.033 ± 0.028	<0.001
S122H	1	0.008 ± 0.004	<0.001

Tabla 13: Factor de Termoestabilidad de mutantes simples. Se muestran los TFs de los controles de IFN- γ , cinco mutantes con 2 y 3 mutaciones y los mutantes simples correspondientes a los mutantes múltiples seleccionados. Se indican el número de mutaciones de cada uno de los clones.

Comparando los TFs de estos mutantes simples respecto a sus mutantes compuestos, pudieron observarse diferentes tipos de mutaciones según su combinación (Fig. 41): en el caso de las mutaciones R162Q y A164E, la primera tiene un efecto nulo sobre el TF mientras que la segunda mutación es más termoestable que el doble mutante (Fig. 41a); mutaciones C21G y F159C contribuyen a la termoestabilidad (Fig. 41b); las mutaciones T50Y, Y121T y M140P: la primera mutación es neutra y las otras dos producen un efecto sumatorio sobre la TF total (Fig. 41c); mutaciones Y22D y S122H: las dos mutaciones son neutras por separado pero confieren una alta termoestabilidad a la proteína cuando se combinan (Fig. 41d).

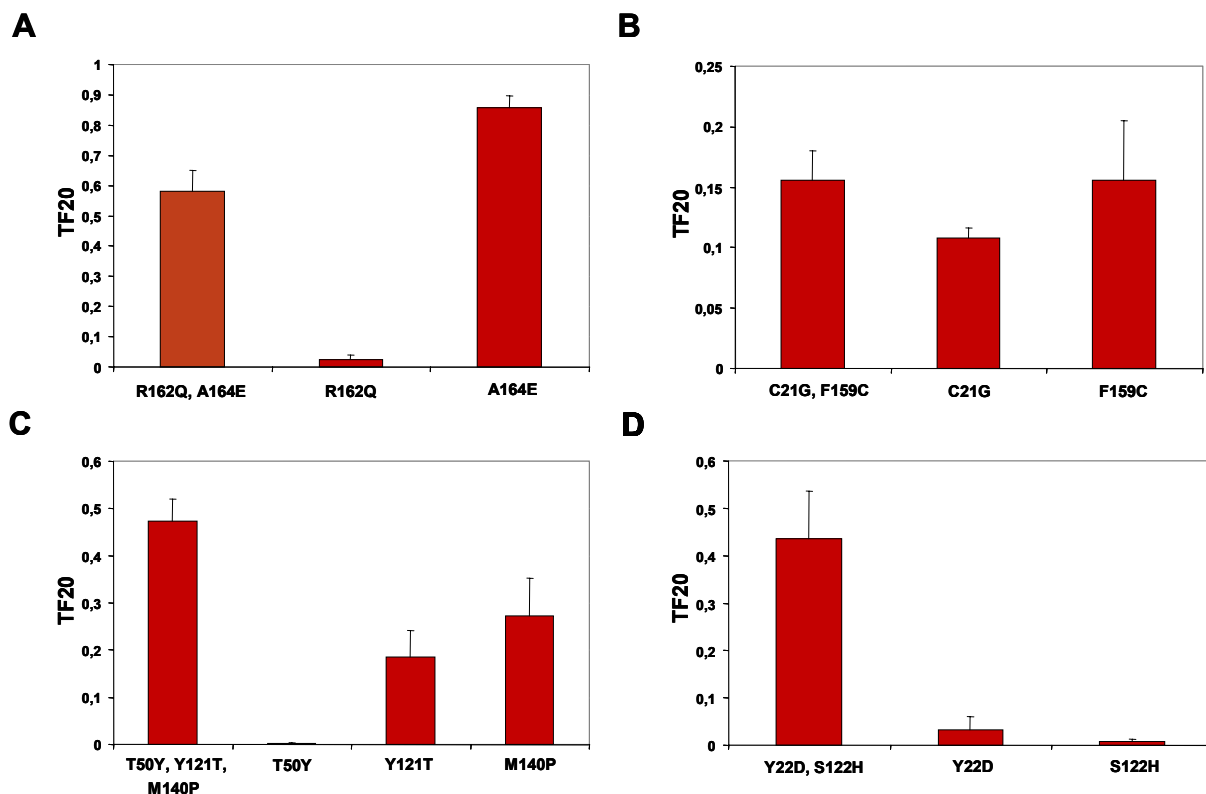


Figura 41: Comparación del Factor de Termoestabilidad. Se muestra una comparación en TF de mutantes de IFN- γ obtenidos respecto a sus mutantes simples obtenidos mediante PCR (Biométhodes). (A) R162Q/A164E: Una mutación es termoestable (A164E) y la otra es nula (R162Q). (B) C21G/F159C: Ambas mutaciones contribuyen a la termoestabilidad pero no hay efecto sumatorio. (C) T50Y/Y121T/M140P: Una mutación es neutra (T50Y) y las otras dos parecen tener efecto sumatorio sobre la TF final. (D) Y22D/S122H: Mutación sinérgica, ambas mutaciones son neutras por separado pero confieren una elevada termoestabilidad cuando se combinan.

Como el proceso de selección es independiente de actividad, el siguiente paso era comprobar cuáles de las proteínas mutantes termoestables mantenían su actividad biológica. Este tercer paso fue realizado en Biométhodes. Las sustituciones de los aminoácidos de interés fueron introducidas en los genes codificantes y las proteínas fueron producidas en células COS-7, para posteriormente realizar un ensayo de actividad biológica. Aproximadamente el 15 % de los mutantes eran inactivos o no fue posible producirlos. La termoresistencia de aquellos que mantenían al menos el 50 % de la actividad de la proteína silvestre fue ensayada, seleccionándose 7 mutantes activos y termoestables: C21W, W59F, M100N, M140P, F159C, R162E y R163T.

4.4.6 Resistencia de mutantes termoestables de IFN- γ a agentes caotrópicos

La digestión enzimática de una proteína ha sido reconocida como un método efectivo para distinguir entre conformaciones plegadas y no plegadas (Park y Marqusee, 2005). La digestión proteolítica efectiva de una proteína requiere el desplegamiento global o local del sustrato (Park y Marqusee, 2004), por lo que las proteínas en diferentes estados de plegamiento tendrán una susceptibilidad proteolítica diferente. Siguiendo el método desarrollado por Park y Marqusee (Park y Marqusee, 2005), quisimos comprobar *in vitro* si los mutantes termoestables de IFN- γ eran más estables frente a desplegamiento que la estirpe silvestre. Para ello realizamos una modificación del ensayo de “pulso proteolítico” (Park y Marqusee, 2005) con la proteína silvestre y los mutantes M100N y F159C de IFN- γ . El ensayo consistía en incubar estas proteínas en concentraciones crecientes de Urea para posteriormente someterlas a un pulso de termolisina. El aumento de la concentración de Urea desnaturaliza las proteínas desplegadas y permite la acción de la termolisina; por tanto las variantes termoestables, que serían más estables al desplegamiento no serían degradadas con tanta facilidad como a la estirpe silvestre. La Figura 42 muestra que los dos mutantes son más resistentes a la degradación por termolisina que la estirpe silvestre. También se puede comprobar que el TF está relacionado de algún modo con la resistencia a la degradación dado que F159C presenta un TF y una resistencia a la degradación proteolítica superior que M100N.

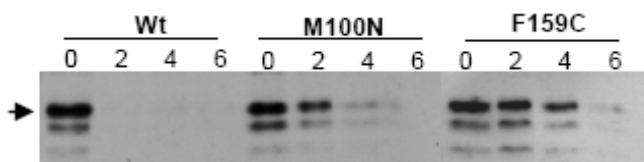


Figura 42: Pulso proteolítico. Western Blot contra Interferón Gamma humano de la proteína silvestre y los mutantes M100N y F159C tras ser sometidos a concentraciones crecientes de Urea (0, 2, 4 y 6 M) y a un pulso de termolisina (Materiales y Métodos).

4.4.7 Localización de mutaciones en la estructura del Interferón Gamma

Una vez calculado el Factor de Termoestabilidad de los mutantes en IFN- γ obtenidos, quisimos conocer la base estructural del incremento en termoestabilidad de estos mutantes. Para ello, utilizamos el programa Deep View y el servidor SWISS-MODEL para generar modelos en los cuales se sustituye el aminoácido de la proteína silvestre por el mutado. Una vez obtenidos estos modelos, utilizamos el programa PyMol para ver la localización de estas mutaciones, comparadas con el aminoácido original, en la estructura del Interferón Gamma humano. La Figura 43 muestra algunos

ejemplos cuya mayor estabilidad podría explicarse por interacciones hidrofóbicas (L51F, Fig. 43a), por interacción entre cargas de la misma cadena (E98K, Fig., 43b), por interacción entre cargas de las dos cadenas del homodímero (S63R, Fig. 43c) o por interacciones hidrofóbicas (M140P, Fig. 43d). No podemos hacer hipótesis sobre el efecto de muchas de las mutaciones más interesantes, ya que éstas se encuentran fuera de la estructura 3D conocida, que va de los aminoácidos Q24 a T149.

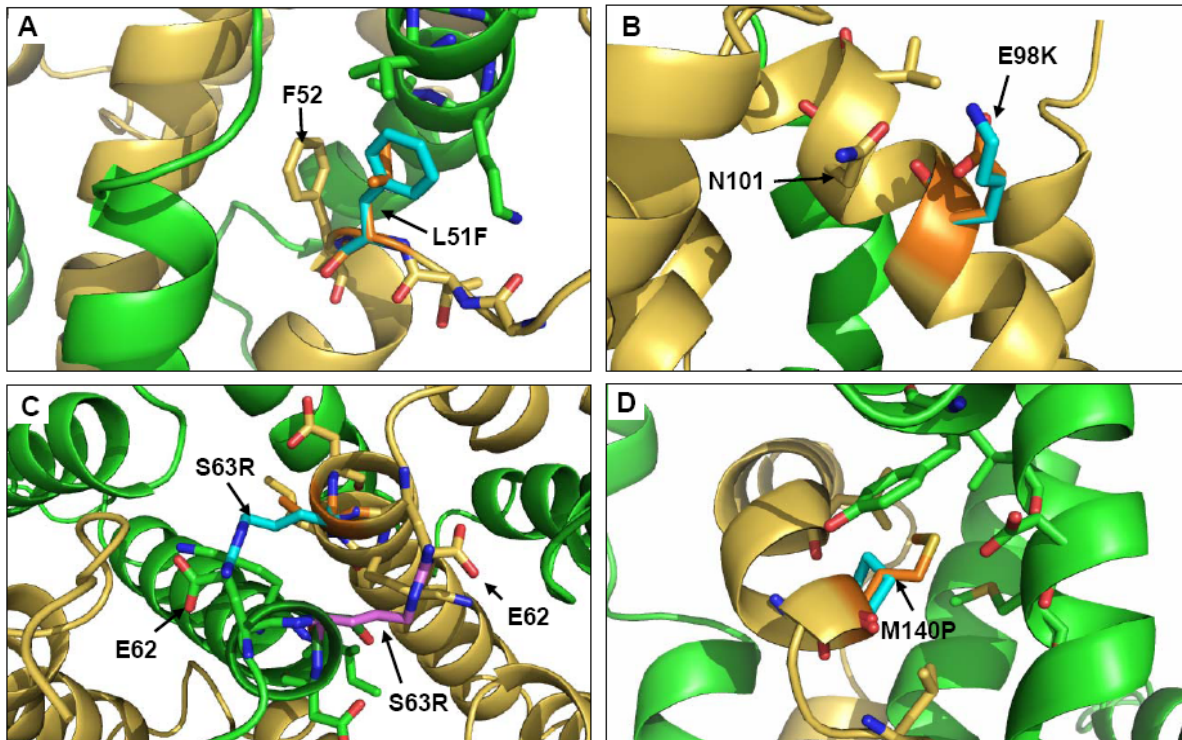


Figura 43: Estructura de mutantes termoestables de IFN- γ . Se muestran las dos cadenas del IFN- γ de color amarillo y verde; el aminoácido de interés se muestra de color naranja (silvestre) y azul claro o violeta (mutado); también se muestran los átomos de oxígenos (color rojo) y de nitrógeno (color azul oscuro). (A) L51F (B) E98K (C) S63R (D) M140P.

DISCUSIÓN

Thermus es uno de los géneros de eubacterias de mayor expansión a nivel mundial y es un excelente candidato entre los termófilos extremos para ser empleado como “factoría celular” para la producción de enzimas termófilas. Por otro lado, la necesidad de herramientas genéticas para *Thermus*, que permitan la expresión heteróloga de genes termófilos, no se limita solo a la producción de termozimas. En ausencia de dichas herramientas, huéspedes como *E. coli* son usados para analizar la función de genes y de sus productos génicos de termófilos e hipertermófilos. Aunque algunas de estas aproximaciones pueden resultar en el conocimiento de una actividad catalizada por tal enzima, existe la posibilidad de que la relevancia en el termófilo sea muy distinta; por ello, tanto para el estudio de la función de ciertos genes *in vivo* como también de su interacción con componentes celulares, es necesario el desarrollo de herramientas de manipulación génica *in vivo* en estos organismos. En esta Tesis Doctoral hemos desarrollado nuevos marcadores de selección que incrementen las posibilidades de selección positiva a altas temperaturas en *Thermus spp.* También hemos desarrollado sistemas de localización *in vivo* basados en la fusión de una proteína de interés con un mutante de GFP que es funcional a altas temperaturas (Pédelacq y cols., 2006), para poder ser utilizado en *Thermus spp* y así conocer más acerca de la organización subcelular de las bacterias termófilas. Por último, hemos desarrollado un método universal que permite la selección de mutantes termoestables de cualquier proteína en *T. thermophilus*. En los siguientes epígrafes se discuten con detalle los resultados obtenidos en la consecución de cada uno de estos objetivos.

Nuevos marcadores de selección

-Higromicina:

La limitación de resistencias a antibióticos disponibles para selección positiva a altas temperaturas en organismos termófilos ha llevado a diversos grupos a tratar de adaptar enzimas mesófilas de resistencia a antibióticos para ampliar el espectro de herramientas disponibles para trabajar con dichos organismos. Hasta 2005, la única resistencia termoestable disponible para selección en *Thermus* era la kanamicina nucleotidil transferasa, aislada en 1985 por Matsumura y Aiba (Matsumura y Aiba, 1985), simultáneamente a Liao (Liao y cols., 1986), utilizando en ambos casos el método de evolución dirigida, empleando por primera vez un organismo termófilo como hospedador. Más adelante, en nuestro laboratorio, este gen fue clonado bajo el control del promotor y la señal de unión al ribosoma del gen *slpA*, que codifica la proteína de capa S de *T. thermophilus*, lo que garantizaba un nivel de expresión elevada en

Thermus. De hecho, este gen de selección pudo ser empleado en copia sencilla para el aislamiento de mutantes de inserción en *T. thermophilus* (Lasa y cols., 1992). Desde entonces se han efectuado diversos intentos de obtener formas estabilizadas de enzimas de resistencia a cloranfenicol y tetraciclina sin éxito. No obstante, en 2001 Cannio (Cannio y cols., 2001) aisló mediante un protocolo de evolución dirigida en *S. solfataricus* un mutante de la higromicina B fosfotransferasa (*hph*) de *E. coli* funcional a 75° C. Como este gen era capaz de expresar un fenotipo de resistencia a higromicina B en *S. solfataricus*, Nakamura trató de adaptarlo a *T. thermophilus* con resultado negativo. En vista de ello desarrolló un protocolo de selección dirigida en *T. thermophilus* mediante el cual aisló mutantes del gen que permitían el crecimiento de *T. thermophilus*, combinando 5 de ellos en el mutante *hph5*, que es el que hemos empleado en la primera parte de la tesis. Partiendo de este gen (*hph5*), generamos un plásmido (pMH184) en el que la actividad de resistencia era expresada desde el promotor *PslpA*. Los ensayos que realizamos con este vector en presencia de higromicina B mostraron que nuestro vector sí era funcional a 70° C, la temperatura óptima de crecimiento de *T. thermophilus*. Los motivos por los cuales nuestro vector pMH184 es funcional a una temperatura mayor que el vector desarrollado por Nakamura podrían estar relacionados con la elevada expresión conferida por el promotor *PslpA*, más potente que el utilizado por Nakamura. Alternativamente, podría ser que el vector de Nakamura fuera inestable a temperaturas superiores a 65° C, mientras que pMH184 sí que es estable a esas temperaturas, como se ha podido comprobar mediante los experimentos realizados (Fig. 13). Dado que también hemos podido comprobar que pMH184 es más tolerante que el vector original respecto a la concentración de higromicina presente en el medio de cultivo, permitiendo el crecimiento a concentraciones de higromicina superiores comparado con el vector original, la explicación más probable apunta a la mayor actividad promotora que dirige la expresión de *hph5* en pMH184.

El desarrollo de vectores basados en la resistencia termoestable a higromicina ha demostrado ser muy útil para el análisis genético de *T. thermophilus*: su compatibilidad con la resistencia a kanamicina nos permite su uso en ensayos de complementación sobre cepas de *T. thermophilus* mutantes de inserción portadores del gen *kat*. En nuestro caso, hemos podido complementar mutantes de inserción en el gen *narC*. Otra utilidad que puede tener este tipo de vectores es su uso para la construcción de vectores de prueba de promotores. Como gen testigo utilizamos, además del ya conocido *bgaA* (Moreno y cols., 2003), el gen *bgl* de *T. thermophilus* que codifica una β -glucosidasa termoestable de menor tamaño que *bgaA*. Para dar

validez al sistema, utilizamos *Pnar* y *Pnqo*, dos promotores sometidos a controles inversos por anoxia y nitrato. Los resultados nos indicaron que este tipo de vectores puede ser utilizado para probar distintos promotores (Fig. 17) (Cava y cols., 2007). Sin embargo, observamos que los derivados sin promotores presentaban unos niveles de expresión bastante mayores (250-300 U.M.) que el fondo (20-30 U.M.). Estos datos indican que hay expresión desde *lacZp* o desde alguna zona próxima, algo que no detectábamos con derivados que empleaban el gen *bgaA* como testigo (Cava y cols., 2007).

-Estreptomicina:

Con anterioridad a la publicación de Nakamura, nosotros intentamos aislar otras resistencias termoestables para *Thermus*, y muy especialmente a estreptomicina, de la que ya se conocía su eficiencia como antibiótico de selección a alta temperatura por los trabajos de análisis de los sistemas de transformación (Koyama y cols., 1986), así como en los de estructura y función del ribosoma de *Thermus* (Gregory y cols., 2001).

Puesto que la información de que disponíamos respecto a la resistencia a estreptomicina en *T. thermophilus* apuntaba como más frecuente la alteración del gen *rpsL*, codificante de S12, y dado el pequeño tamaño de éste, pensamos que sería factible la utilización de algún alelo mutante de este gen como criterio de selección. De hecho, la estrategia que seguimos para obtener un alelo de alta eficiencia de transformación y seleccionable sobre estreptomicina dio fruto de forma inmediata, permitiendo aislar el alelo *rpsL1* que, para nuestra sorpresa, acumulaba dos mutaciones en vez de una. Este hecho es teóricamente poco esperable debido a la baja probabilidad de una mutación doble simultánea (10^{-12} a 10^{-14}), salvo que sucediera de forma secuencial a través de alguna clase de selección efectiva durante las primeras generaciones. La fuerza selectiva más probable podría ser el requerimiento de una mutación compensatoria secundaria que pudiera aliviar un fuerte defecto en el crecimiento provocado por la mutación primaria. En este caso, es interesante comparar el alelo *rpsL1* de *T. thermophilus* con los mutantes de *E. coli* dependientes de estreptomicina descritos por Timms y Bridges (Timms y Bridges, 1993). Estos autores encontraron que los mutantes dobles en *rpsL* aparecían con una elevada frecuencia entre los mutantes dependientes de estreptomicina espontáneos o inducidos mediante radiación ultravioleta, y sugirieron la existencia de un estado transitorio de hipermutabilidad del organismo que permitiría la aparición de mutaciones compensatorias durante las primeras generaciones de las cepas portadoras de una

mutación única. Además, los autores distinguieron entre mutaciones “primarias” y “auxiliares”, en referencia a la aparición de las primeras en algunos alelos con una sola mutación de dependencia de estreptomicina, mientras que las segundas fueron encontradas como mutaciones acompañantes de las más antiguas. Sin embargo, el efecto individual de estas mutaciones auxiliares no fue analizado en detalle en estos mutantes de *E. coli*. Por el contrario, en este trabajo hemos conseguido la separación de las mutaciones en *T. thermophilus* mediante transformación con fragmentos de *rpsL1*. Así, hemos podido observar que cada una de las mutaciones de forma individual confiere un fenotipo de dependencia de estreptomicina, aunque ambas requieren concentraciones mayores de estreptomicina que el mutante doble para su crecimiento (Fig. 22). Usando este criterio no podemos determinar cual de las dos mutaciones podría ser considerada como “primaria”. Sin embargo, la comparación con la proteína S12 de *E. coli* favorece al reemplazo K47R como mutación primaria, ya que la posición K43 de la proteína S12 de *E. coli*, equivalente a K47 en *T. thermophilus*, es un blanco frecuente para mutaciones dependientes de estreptomicina (K43E en *E. coli*), mientras que el residuo R53 de *E. coli*, correspondiente a K57 en *T. thermophilus*, ha sido descrito como blanco para diferentes mutaciones auxiliares (R53S, R53C y R53L en *E. coli*) con respecto a la mutación dependiente de estreptomicina primaria P90L en *E. coli* (Timms y Bridges, 1993). Estos datos indican que el alelo *rpsL1* fue seleccionado mediante la incorporación de una mutación compensatoria (K57E) durante los primeros ciclos de división celular de un mutante K47R.

Las razones estructurales de por qué estas mutaciones, y especialmente K57E, confieren un fenotipo de dependencia a estreptomicina, son difíciles de definir debido al gran número de interacciones implicadas. Existen indicios (Blas-Galindo y cols., 2007, Material Suplementario) de un desplazamiento global de los residuos 1490 a 1493 del rRNA 16S cercanos al sitio de unión de estreptomicina, detectados por comparaciones de los ángulos diédricos entre las estructuras “abierta”, “cerrada” y unidas a estreptomicina de la subunidad ribosómica 30S de *T. thermophilus*, que apoyan la idea de que la estreptomicina fija la estructura de la subunidad en una conformación similar a la “cerrada”. Las mutaciones K47R y K57E afectan independientemente a las cargas electrostáticas y a la conformación estérica de esta región (Fig. 23), desplazando el rRNA 16S de forma que resulta difícil formar una conformación “cerrada” funcional (Fig. 23). En este escenario la presencia de estreptomicina podría compensar este efecto parcialmente al actuar como una especie de chaperona química, permitiendo a la estructura recuperar su capacidad de acomodar los cambios conformacionales requeridos para ser funcional.

Uno de los resultados más sorprendentes y afortunados que obtuvimos al analizar *rpsL1* es el descubrimiento de su carácter dominante sobre el gen *rpsL* silvestre cuando ambos están presentes en la célula. Vimos este carácter dominante cuando expresamos el alelo *rpsL1* como una única copia en el cromosoma tras la integración tanto del plásmido integrativo pS18a o su derivado pS18ΔnarC. En el primer caso, el alelo *rpsL1* fue expresado como parte de su operón natural (“cis” en Fig. 27c) en todas las colonias analizadas. Por otro lado, los plásmidos pS18ΔnarC y pMS18 también confieren un fenotipo de dependencia de estreptomicina, a pesar de la presencia del gen silvestre *rpsL* expresado en “cis” desde su operón. En consecuencia, la única explicación a estos resultados es que el alelo *rpsL1* produce un fenotipo de dependencia de estreptomicina dominante, independientemente de ser expresado en monocopia como parte del operón (pS18a) o desde otro locus en el cromosoma (pS18ΔnarC), o en multicopia desde un plásmido (pMS18).

Aún no alcanzamos a entender la razón de esta dominancia. De hecho, sería esperable que la presencia de mezclas de ribosomas mutantes y silvestres en una cepa conteniendo los alelos *rpsL* y *rpsL1* la capacitara para crecer tanto con como sin estreptomicina. Como este no es el caso, el fenotipo de dependencia de estreptomicina tiene que estar necesariamente relacionado con algún tipo de interferencia durante la síntesis de los ribosomas silvestres en presencia de la proteína mutante S12 (K47R/K57E).

El alelo *rpsL1* ha sido probado con éxito como un marcador de selección positivo alternativo al gen *kat* para la construcción de plásmidos, lo que ha permitido la expresión de genes en fondos genéticos sensibles y resistentes a kanamicina. En ambos casos, la expresión de los genes de selección en copia única empleando derivados de pS18a fue posible en el 70-80 % de las colonias transformantes dependientes de estreptomicina. El que el porcentaje no alcanzara el 100 % era algo esperado debido a la posible integración del plásmido en el cromosoma a través de regiones parcialmente homólogas a los genes clonados, que podría resultar en genes no funcionales, o por eventos de doble recombinación que podrían resultar en el reemplazamiento del gen *rpsL* por su alelo *rpsL1*, con la consiguiente escisión del plásmido. Por contra, el éxito en la complementación fue cercano al 100 % en las colonias transformadas con derivados del plásmido replicativo, que no necesita recombinar en el cromosoma para ser mantenido en la célula. En conclusión, los plásmidos basados en *rpsL1* constituyen una nueva herramienta genética para *T.*

thermophilus, útil tanto para la expresión de genes heterólogos como para la complementación de cepas resistentes a kanamicina.

Aprovechando su carácter dominante, la aplicación más prometedora del alelo *rpsL1* se basa en su fácil contraselección en un medio de cultivo libre de estreptomicina. Esto nos ha permitido desarrollar un método rápido y directo para el aislamiento de mutantes de delección de un gen blanco en un único paso. Este proceso ha sido aplicado en el aislamiento de mutantes $\Delta narC$ para compararlo con el procedimiento descrito por Tamakoshi (Tamakoshi y cols., 1999), que utilizamos previamente con el mismo objetivo (Olga Zafra, Tesis Doctoral). Este método requiere la producción de un mutante $\Delta pyrE$ (Ura⁻) de la cepa parental previamente a la selección de inserciones *gen::pyrE* en medios de cultivo sin uracilo. En un paso ulterior, se transforma con un DNA Δ blanco y se selecciona con ácido fluororótico para contraseleccionar la presencia del gen *pyrE* y generar el mutante Δ blanco sin marcador. Éste puede volver a ser empleado para la obtención posterior de mutantes dobles, triples, etc., repitiendo el ciclo las veces necesarias. El método que proponemos es mucho más rápido y simple, puesto que solo es necesario un único plásmido con la construcción requerida y placas de medio rico con y sin estreptomicina.

Localización de estructuras mediante sGFP

La sGFP es un mutante seleccionado en *E. coli* por su mayor capacidad para plegar correctamente respecto al parental frGFP, cuando estaba fusionada al dominio C-terminal de una subunidad de ferritina de difícil plegamiento (Pédélec y cols., 2006). Estudios *in vitro* revelaron que sGFP era capaz de plegar a concentraciones de urea mayores que las toleradas por la proteína parental, lo cual apoyaba la idea de una mayor termoestabilidad. Sin embargo, la capacidad de sGFP de plegar a altas temperaturas, esto es, su “termoactividad” no pudo ser demostrada. Éste fue uno de los puntos que tratamos de analizar, expresando sGFP a 70°C en un hospedador modelo termófilo seguido de una fijación *in vivo* con formaldehído a alta temperatura para atrapar el estado de plegamiento alcanzado por la proteína a esa temperatura. Los resultados de nuestros experimentos apoyan que sGFP se auto-oxida y cicla para alcanzar su estado fluorescente (Remington, 2006) cuando es expresada a 70° C, lo que refuerza su carácter termoactivo además de termoestable.

Debido a las propiedades termoestables y termoactivas exhibidas por sGFP, pensamos que esta proteína podría servir como una herramienta de localización en termófilos. Por tanto, desarrollamos un vector lanzadera *E. coli-T. thermophilus* para la expresión controlada de las proteínas de interés fusionadas con sGFP en ambos organismos, dado que contenía promotores específicos de cada organismo. Para la expresión de las proteínas de fusión en *E. coli* utilizamos el promotor *lacZp*, el cual o no es reconocido o lo es de forma muy limitada por la maquinaria de transcripción de *T. thermophilus* *in vivo*. Por otro lado, el promotor *Pnqo* no es reconocido en *E. coli*. De esta manera es posible controlar los niveles de expresión de las proteínas fusión con sGFP en ambas bacterias. Por ejemplo, la expresión de la fusión periplásmica PhoA-sGFP (Fig. 36) no puede ser llevada a cabo a una actividad plena del promotor *Pnqo* para impedir la saturación del compartimento, y por tanto requiere de condiciones de crecimiento en microaerofilia con nitrato, que limitan la transcripción de *Pnqo* (Cava y cols., 2007).

La translocación de PhoA-sGFP al periplasma de *T. thermophilus* merece atención especial. Trabajos previos con la proteína PhoA revelaron que la secreción a periplasma en *E. coli* era TAT-("twin arginine transporter") dependiente (Angelini y cols., 2001); en *T. thermophilus* se vio su secreción al espacio periplásmico en mutantes formadores de cuerpos multicelulares (Castán y cols., 2002), pero la vía por la cual esta proteína cruzaba la membrana en *T. thermophilus* no era conocida. Como el sistema sec-dependiente es incapaz de translocar proteínas plegadas, y el sistema TAT parece permitir sólo el tránsito de proteínas correctamente plegadas* (DeLisa y cols., 2003; Lee y cols., 2006), nuestros datos sugieren que la secreción de PhoA-sGFP al periplasma debe ser debida al sistema TAT en *T. thermophilus*. Además, la eficiencia de la secreción de PhoA-sGFP al periplasma (Fig. 37) sugiere que el plegamiento de GFP es relativamente rápido tras su síntesis en el citoplasma a 70° C para que el transportador TAT pueda mover la fusión completa a través de la membrana.

* Esta propiedad ha sido utilizada como herramienta para seleccionar variantes de proteínas con una capacidad de plegamiento y solubilidad incrementada (Fisher y cols., 2006), e incluso para hacer un sistema bacteriano de doble híbrido (Strauch y Georgiou, 2007) utilizando la propiedad de "autoestopista" ("hitch-hiker") de los complejos de proteínas transportados mediante sistema TAT (Rodrigue y cols., 1999).

Selección de mutantes termoestables

El incremento de la estabilidad de las proteínas termófilas no puede ser atribuido a un único determinante común, sino al efecto aditivo de un número mayor de las interacciones habituales entre los aminoácidos: interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos, puentes de hidrógenos y puentes disulfuro (Nosoh y Sekiguchi, 1990; Kumar y Nussinov, 2001). Generalmente, las proteínas termófilas presentan respecto a las mesófilas un conjunto de sustituciones aminoacídicas con efectos aditivos en su estabilidad que las convierten en una estructura mucho más compacta y rígida, lo cual disminuye la desnaturalización térmica (Karshikoff y Ladenstein, 2001). Sin embargo, no es fácil predecir qué cambios hay que hacer en una proteína para convertirla en termoestable, incluso conociendo la estructura 3D.

En el último capítulo de este trabajo describimos un sistema de selección de variantes termoestables, en principio de cualquier proteína, empleando *T. thermophilus* como hospedador. El sistema parte de la premisa de que las proteínas mutantes termoestables deben plegar mejor a temperaturas elevadas que su parental mesófila, y utiliza el principio de “interferencia de plegamiento” sobre una proteína testigo que confiere resistencia termoestable a kanamicina. En el vector desarrollado (pNCK) puede clonarse de forma dirigida el gen codificante de una proteína de interés, generando una fusión N-terminal a la kanamicina nucleotidil transferasa. Dicha fusión es expresada desde el promotor *PslpA*, garantizando un nivel elevado de expresión, de forma que los mutantes más estables provocan un nivel de resistencia a kanamicina mayor, dando lugar a clones resistentes al antibiótico.

En el caso del ejemplo que hemos empleado para desarrollar el método, el Interferón Gamma humano, ya se disponía de datos bibliográficos anteriores donde se describían algunas mutaciones termoestables, lo que nos permitió ensayar la viabilidad de nuestro planteamiento. De hecho, los mutantes $\Delta 10$ y M4 fusionados al gen *kat* ofrecieron unos niveles de resistencia a kanamicina mayores que la forma silvestre tanto a 60 como a 70° C.

Tras el proceso de selección sobre una genoteca muy amplia, obtuvimos una serie de sustituciones de aminoácidos que en muchos casos se repetían, indicando la fiabilidad del proceso. No obstante, y tal vez como se esperaba del carácter independiente de actividad del sistema, muchas de las sustituciones aisladas no presentaban actividad biológica tras ser expresadas en células eucarióticas. De hecho,

solo 7 mutaciones demostraron ser realmente activas y estables. En la Figura 44 se muestra el análisis de la estabilidad de dos de ellas realizados por la empresa Biométhodes. Es interesante destacar que el nivel de estabilidad pudo ser comparado de forma coherente con el de estabilidad frente a desnaturalización por urea en los ensayos de “pulso proteolítico” (Fig. 42), confirmando la relación entre las mutaciones seleccionadas y una mayor rigidez estructural.

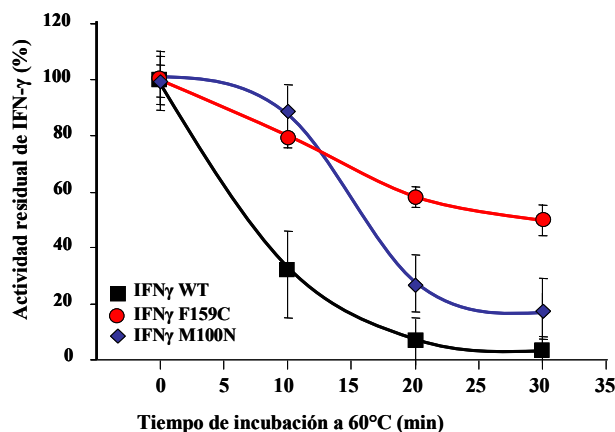


Figura 44: Actividad residual de mutantes de IFN-γ. La gráfica muestra la cinética de termo-resistencia a 60° C de dos mutantes termoestables de IFN-γ. Los datos están expresados en unidades relativas de luz (RLUs). La actividad residual está expresada como un porcentaje de la actividad total en ausencia del paso de desnaturalización. Ninguno de los mutantes muestra más de un 10 % de diferencia de actividad específica cuando se comparan con la proteína silvestre.

Por otra parte, la generalización del sistema fue confirmada en trabajos de la empresa Biométhodes posteriores a éste, en el que estabilizaron con éxito otras proteínas. Por un lado han obtenido 21 mutantes termoestables de IFN-α humano y 18 variantes termoestables de IFN-β humano. Por otro lado, la técnica ha sido probada también con enzimas, obteniéndose mutantes termoestables y termoactivos de la lipasa A de *B. subtilis* (LipA, 20 kDa) y de la formiato deshidrogenasa (FdH, 45kDa) de *Pseudomonas* sp.101 (Chautard y cols., 2007). Estos resultados muestran que, además de para seleccionar formas termoestables, el método sirve para seleccionar formas termoactivas, abriendo un enorme campo para su aplicación generalizada. La comparación de este método con otras técnicas de selección de formas termoestables independientes de actividad es bastante favorable. Por ejemplo, la técnica Proside (“protein stability increased by directed evolution”) (Sieber y cols., 1998) vincula la resistencia a proteasas de las variantes estables de una proteína con la infectividad de un fago filamentoso, pero tiene limitaciones respecto al tamaño de la proteína a seleccionar (<110 aminoácidos); otros sistemas, como “yeast display” (Richman y cols.,

2006), de expresión en levaduras, pueden aplicarse para la selección de mutantes termoestables de proteínas de mayor tamaño que Proside, pero requieren anticuerpos específicos que no siempre están disponibles para la proteína de interés. En nuestra técnica la limitación por tamaño aún no está definida, pero se ha aplicado con éxito a proteínas de 45 kDa y es más sencilla y barata que la técnica de “yeast display”. Por otra parte, la desventaja mayor del nuevo procedimiento es que hay que realizar una selección final o comprobación de la actividad, dado que se selecciona plegamiento y no actividad. A pesar de esto, el porcentaje de los mutantes activos entre los termoestables seleccionados es lo suficientemente alto como para que no sea un proceso tedioso encontrar una proteína mutante activa: en el caso del IFN- γ , fueron identificadas y clonadas 50 mutaciones simples de entre los 31 clones seleccionados. 7 de los clones con mutaciones simples mantienen más de un 50 % de actividad, lo que supone un 14 % del total; estos porcentajes son superiores en los ensayos realizados con IFN- α (22 %) e IFN- β (37 %). Otra ventaja del sistema es la posibilidad de seleccionar mutantes de proteínas con puentes disulfuro en el interior celular, dado que como ha sido descrito recientemente (Beebey y cols., 2005) y como hemos comprobado con el mutante M4 (E30C/S92C), es posible formar puentes disulfuro en el citoplasma de *T. thermophilus*. Esto resulta contradictorio con el punto de vista clásico, que indica que los puentes disulfuro estructurales estaban presentes exclusivamente en el medio extracelular y en proteínas compartimentalizadas, ya se consideraba que el ambiente reductor del citosol evitaba la formación de enlaces disulfuro estables (Fahey y cols., 1977; Branden y Tooze, 1991). La habilidad de los organismos termófilos para formar enlaces disulfuro es una propiedad muy interesante, ya que permite el plegamiento y correcta selección de proteínas que contengan este tipo de enlaces. En los ensayos realizados para validar nuestro método de termoselección hemos podido seleccionar el mutante de IFN- γ E30C/S92C (al que denominamos M4), así como el IFN- α e IFN- β (que contienen puentes disulfuro).

En conjunto, estos datos apoyan la idea de que este nuevo método de termoselección de proteínas utilizando a *T. thermophilus* como hospedador, permite un aumento considerable en el número de proteínas susceptibles de ser termoestabilizadas. Además, no requiere un conocimiento previo de la estructura de la proteína, como puede verse tomando como ejemplo al IFN- γ humano, la proteína que tomamos como modelo. De las 7 mutaciones activas y termoestables seleccionadas (C21W, W59F, M100N, M140P, F159C, R162E, R163T), solo 3 se encuentran en la estructura cristalina resuelta del IFN- γ : de los 166 aminoácidos de la proteína, se conoce la estructura desde el aminoácido 24 al 149. Es interesante el hecho de que

aproximadamente el 40 % de todas las mutaciones seleccionadas se encuentran en las regiones no resueltas de la estructura (correspondiente al 24 % de la secuencia de la proteína) (Fig. 45). Otro punto interesante es ver que la mayor parte de las mutaciones seleccionadas en el IFN- γ se encuentran agrupadas en zonas muy concretas, por ejemplo encontramos 15 mutaciones en la primera selección entre los aminoácidos C21 y P26, o 6 mutaciones entre los aminoácidos R162 y S165. Quizá estas mutaciones ayudan en la termoestabilidad de la proteína al aumentar la rigidez de estas zonas flexibles, y por tanto de la estructura. En todo caso, resulta evidente que ninguna de ellas podría haber sido prevista mediante el estudio estructural.

MKYTSYILAFQLCIVLGS LG CYCQDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGT
LFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMN
VKFFNSNKKKRDDFEKL TNYSVTD LNVQRKAIHEL IQVMAELSPA AKTGK
RKRSQMLFRGRASQ

Figura 45: Secuencia de aminoácidos del IFN γ humano. La secuencia subrayada corresponde a la parte de la proteína cuya estructura es conocida (desde Q24 a T149). En color se marcan el número de mutaciones encontradas tras la primera selección en cada posición: rosa (1 mutación), naranja (2), verde (3), azul (4+).

CONCLUSIONES

De la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Se han desarrollado vectores que confieren resistencia termoestable a higromicina en *Thermus thermophilus*. Dichos vectores son seleccionables en fondos genéticos resistentes a kanamicina y pueden ser empleados para la expresión de proteínas y para complementación de mutaciones, y para el ensayo de promotores, empleando en este caso los genes testigo *bgaA* o *bgl*.

2. Se ha aislado el alelo *rpsL1*, codificante de una proteína S12 con las mutaciones K47R y K57E, cuya expresión confiere a *Thermus thermophilus* un fenotipo dominante de dependencia de estreptomicina.

3. Las mutaciones K47R y K57E han sido separadas y producen de manera individual dependencia de estreptomicina. Nuestros datos de velocidad de crecimiento indican que la mutación K47R precedió a la K57E.

4. Existen indicios basados en el modelado molecular de la subunidad 30S de que las mutaciones de la proteína S12 provocan un bloqueo de la estructura en su forma cerrada siendo necesaria la inserción de la estreptomicina como una especie de chaperona química que compensa parcialmente este efecto, permitiendo la formación de la estructura abierta.

5. El alelo *rpsL1* puede ser utilizado como marcador de selección positiva en vectores suicidas y replicativos.

6. Se ha desarrollado un protocolo de delección dirigida de genes sin dejar huella genética aprovechando el carácter dominante del gen *rpsL1* como elemento de selección negativa en ausencia de estreptomicina.

7. La variante termoestable sGFP puede ser expresada en forma activa a 70° C en *Thermus thermophilus*, siendo el primer marcador de localización disponible para bacterias termófilas. Su unión a PhoA permite la secreción en forma activa al periplasma de *Thermus thermophilus*.

8. Se ha desarrollado un sistema universal de selección de mutantes termoestables de cualquier proteína basado en la interferencia de plegamiento producida por éstas al ser expresadas como dominio N-terminal fusionado a la kanamicina nucleotidil transferasa. El sistema es capaz de seleccionar sobre genotecas de gran tamaño y ha sido probado con proteínas de hasta 45 kDa y con puentes disulfuro.

9. Han sido identificadas mutaciones termoestabilizantes en el Interferón Gamma humano, muchas de las cuales se encuentran en regiones de la proteína no cristalizadas por lo que no podrían haber sido deducidas mediante ingeniería de proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.W., and Kelly, R.M. (1998) Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends in Biotechnology* **16**(8):329-332.
- Aggarwal, B.B. (1992) Comparative analysis of the structure and function of TNF-alpha and TNF-beta. *Immunol Ser* **56**:61-78.
- Allen, P.N., and Noller, H.F. (1989) Mutations in ribosomal proteins S4 and S12 influence the higher order structure of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol* **208**(3):457-468.
- Angelini, S., Moreno, R., Gouffi, K., Santini, C., Yamagishi, A., Berenguer, J., and Wu, L. (2001) Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **506**(2):103-107.
- Asatryan, L.S., and Spirin, A.S. (1975) Non-enzymatic translocation in ribosomes from streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **138**(4):315-321.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1994) Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, New York*.
- Bach, E.A., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **15**:563-591. Review.
- Beeby, M., O'Connor, B.D., Ryttersgaard, C., Boutz, D.R., Perry, L.J., Yeates and T.O. (2005) The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biol* **3**(9):1549-1558.
- Berk, V., Zhang, W., Pai, R.D., and Cate, J.H. (2006) Structural basis for mRNA and tRNA positioning on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(43):15830-15834.
- Bilgin, N., Claesens, F., Pahverk, H., and Ehrenberg, M. (1992) Kinetic properties of *Escherichia coli* ribosomes with altered forms of S12. *J Mol Biol* **224**(4):1011-1027.
- Blas-Galindo, E., Cava, F., López-Viñas, E., Mendieta, J., and Berenguer, J. (2007) Use of a dominant rpsL allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **73**(16):5138-5145.
- Bohman, K., Ruusala, T., Jelenc, P.C., and Kurland, C.G. (1994) Kinetic impairment of restrictive streptomycin-resistant ribosomes. *Mol Gen Genet* **198**(1):90-99.
- Bolinger, A.M., and Taeubel, M.A. (1992) Recombinant interferon gamma for treatment of chronic granulomatous disease and other disorders. *Clin Pharm* **11**(10):834-850.

- Branden, C., and Tooze, J. (1991) Introduction to protein structure. *New York: Garland Publishing*.
- Brendler, T., Sawitzke, J., Sergueev, K., and Austin, S. (2000) A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. *EMBO J* **19**(22):6249-6258.
- Brickman, E., and Beckwith, J. (1975) Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and phi80 transducing phages. *J Mol Biol* **96**(2):307-316.
- Brock, T.D., and Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* **98**:289-297.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M. Jr, Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000) The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**(7):1143-1154.
- Brouns, S.J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A.P., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2005) Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* **280**:11422-11431.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E.M., and Boom, R.M. (2001) Thermozyms and their applications. *Appl Biochem Biotechnol* **90**(2):155-186. Review.
- Cabantous, S., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2005) Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **23**(1):102-107.
- Cairns, J., Overbaugh, J., and Miller, S. (1988) The origin of mutants. *Nature* **335**(6186):142-145.
- Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M., and Bartolucci, S. (2001) Thermoadaptation of a mesophilic hygromycin B phosphotransferase by directed evolution in hyperthermophilic Archaea: selection of a stable genetic marker for DNA transfer into *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **5**(3):153-159.

- Carr, J.F., Gregory, S.T., and Dahlberg, A.E. (2005) Severity of the streptomycin resistance and streptomycin dependence phenotypes of ribosomal protein S12 of *Thermus thermophilus* depends on the identity of highly conserved amino acid residues. *J Bacteriol* **187**(10):3548-3550.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**(6802):340-348.
- Castán, P., Zafra, O., Moreno, R., de Pedro, M.A., Vallés, C., Cava, F., Caro, E., Schwarz, H., and Berenguer, J. (2002) The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidence from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. *Extremophiles* **6**(3):225-232.
- Cava, F., de Pedro, M.A., Schwarz, H., Henne, A., and Berenguer, J. (2004) Binding to pyruvylated compounds as an ancestral mechanism to anchor the outer envelope in primitive bacteria. *Mol Microbiol* **52**(3):677-690.
- Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafl, Z., Blas-Galindo, E., Gómez-Puertas, P., and Berenguer, J. (2007) Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Mol Microbiol* **64**(3):630-46.
- Cava, F., de Pedro, M.A., Blas-Galindo, E., Waldo, G.S., Westblade, L.F., and Berenguer, J. (2007b) Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures *in vivo*: a tool to study extreme thermophile biology. *Enviromen Microbiol* Pendiente de publicación.
- Coolbear, T., Daniel, R.M., and Morgan, H.W. (1992) The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **45**:57-98.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**(1 Spec No):33-38.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148):802-805.

- Chautard, H., Blas-Galindo, E., Menguy, T., Grand'Moursel, L., Cava, F., Berenguer, J., and Delcourt, M. (2007) An activity-independent selection system of thermostable protein variants.. *Nat Methods* **4**(11):919-921.
- da Costa, M.S., Rainey, N.F., and Rainey, F.A (2001) Bergey's manual of systematic bacteriology, ed. G.M. Garrity. Vol. I, *New York: Springer*.
- Davies, J., Gilbert, W., and Gorini, L. (1964) Streptomycin, supression and the code. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**:883-890.
- de Grado, M., Lasa, I., and Berenguer, J. (1998) Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile. *FEMS Microbiol Lett* **165**(1):51-7.
- de Grado, M., Castán, P., and Berenguer, J. (1999) A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **42**(3):241-245.
- Degryse, E., Glansdorff, N., and Piérard, A. (1978) A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. *Arch Microbiol* **117**(2):189-196.
- Saboulard, D., Dugas, V., Jaber, M., Broutin, J., Souteyrand, E., Sylvestre, J., and Delcourt, M. (2005) High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips. *Biotechniques* **39**(3):363-368.
- DeLisa, M.P., Tullman, D., and Georgiou, G. (2003) Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(10):6115-6120.
- Eigen, M., and de Maeyer, L. (1966) Chemical means of information storage and readout in biological systems. *Naturwissenschaften* **53**(3):50-57.
- Fahey, R.C., Hunt, J.S., and Windham, G.C. (1977) On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins. *J Mol Evol* **10**(2):155-160.
- Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* **11**:571-611.
- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., and Phillips, G.J. (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**(14):4068-4076.

- Fernández-Herrero, L.A., Olabarria, G., Castón, J.R., Lasa, I., and Berenguer, J. (1995) Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **177**(19):5460-5466.
- Fields, P.A. (2001) Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**(2-3):417-431. Review.
- Fisher, A.C., Kim, W., and DeLisa, M.P. (2006) Genetic selection for protein solubility enabled by the folding quality control feature of the twin-arginine translocation pathway. *Protein Sci* **15**(3):449-458.
- Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., Puglisi, J.D. (1996) Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*. **274**(5291):1367-1371.
- Fridjonsson, O., Watzlawick, H., and Mattes, R. (2002) Thermoadaptation of alpha-galactosidase AgaB1 in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **184**(12):3385-3391.
- Gale, E.F., Cundlife, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., and Waring, M.J. (1981) The molecular basis of antibiotic action. *John Wiley & Sons, London, United Kingdom*, p. 402-547.
- Giepmans, B.N., Adams, S.R., Ellisman, M.H., and Tsien, R.Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**(5771):217-224.
- Gonzalez, B., Vasquez, C., Bull, P., and Vicuña R. (1984) Electron microscopy mapping of *Escherichia coli* RNA polymerase-binding sites on plasmids from thermophilic bacteria. *DNA* **3**(3):251-257.
- Gray, P.W., and Goeddel, D.V. (1982) Structure of the human immune interferon gene. *Nature* **298**(5877):859-863.
- Gregory, S.T., Cate, J.H., and Dahlberg, A.E. (2001) Streptomycin-resistant and streptomycin-dependent mutants of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* **309**(2):333-338.
- Gregory, S.T., Carr, J.F., and Dahlberg, A.E. (2005) A mutation in the decoding center of *Thermus thermophilus* 16S rRNA suggests a novel mechanism of streptomycin resistance. *J Bacteriol* **187**(6):2200-2202.

- Gromadski, K.B., and Rodnina, M.V. (2004) Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **11**(4):316-322.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15):2714-2723.
- Gupta, R.S. (2000) The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* **26**(2):111-131.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4):557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In DNA cloning: a practical approach. D. M. Glover. Oxford, IRL Press. Glover, D.M. (ed). Oxford: IRL Press, p. 109-135.
- Hasenbank, R., Guthrie, C., Stöffler, G., Wittmann, H.G., Rosen, L., and Apirion, D. (1973) Electrophoretic and immunological studies on ribosomal proteins of 100 *Escherichia coli* revertants from streptomycin dependence. *Mol Gen Genet* **127**(1):1-18.
- Hogan, B.P., Hartsch, T., and Erie, D.A. (2002) Transcript cleavage by *Thermus thermophilus* RNA polymerase. Effects of GreA and anti-GreA factors. *J Biol Chem* **277**(2):967-975.
- Hooft, R.W., Sander, C., Scharf, M., and Vriend, G. (1996) The PDBFINDER database: a summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value. *Comput Appl Biosci* **12**(6):525-529.
- Huang, W.M., Libbey, J.L., van der Hoeven, P., and Yu, S.X. (1998) Bipolar localization of *Bacillus subtilis* topoisomerase IV, an enzyme required for chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(8):4652-4657.
- Hudson, J., Morgan, H., and Daniel, R. (1989). Numerical classification of *Thermus* isolates globally distributed hot springs. *System. Appl. Microbiol.* **11**: 250-256.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1):23-28.
- Isaac, A., and Lindermann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-267.

- Itoh, T., Takemoto, K., Mori, H., and Gojobori, T. (1999) Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Mol Biol Evol* **16**(3):332-346.
- Jacobs, C., Domian, I.J., Maddock, J.R., and Shapiro, L. (1999) Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**(1):111-120.
- Ju, J., Luo, T., and Haldenwang, W.G. (1998) Forespore expression and processing of the SigE transcription factor in wild-type and mutant *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**(7):1673-1681.
- Karshikoff, A., and Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends Biochem Sci* **26**(9):550-556.
- Koonin, E.V., and Galperin, M.Y. (1997) Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology. *Curr Opin Genet Dev* **7**(6):757-763.
- Koyama Y., Hoshino T., Tomizuka N. y Furukawa K. (1986). Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* **166**(1): 338-340.
- Kumar, S., and Nussinov, R. (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci* **58**(9):1216-1233.
- Kurland, C.G., Hughes, D., Ehrenberg, D. (1996) Limitations of Translational Accuracy. Eds. Neidhardt, F.C. et al, ASM, Washington DC, pag. 979-1003.
- Laptenko, O., and Borukhov, S. (2003) Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus*. *Methods Enzymol* **371**:219-232.
- Laptenko, O., Kim, S.S., Lee, J., Starodubtseva, M., Cava, F., Berenguer, J., Kong, X.P., and Borukhov, S. (2006) pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *EMBO J* **25**(10):2131-2141.
- Lasa, I., Castón, J.R., Fernández-Herrero, L.A., de Pedro, M.A., and Berenguer, J. (1992) Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus* HB8. *Mol Microbiol* **6**(11):1555-1564.

- Lasa, I., de Grado, M., de Pedro, M.A., and Berenguer, J. (1992b) Development of *Thermus-Escherichia* shuttle vectors and their use for expression of the *Clostridium thermocellum celA* gene in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **174**(20):6424-6431.
- Lee, P.A., Tullman-Ercek, D., and Georgiou, G. (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* **60**:373-395.
- Lennox E. X. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190-206.
- Lewis, P.J., Thaker, S.D., and Errington, J. (2000) Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **19**(4):710-718.
- Liao, H., McKenzie, T., and Hageman, R. (1986) Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(3):576-580.
- Lioliou, E.E., Pantazaki, A.A., and Kyriakidis, D.A. (2004) *Thermus thermophilus* genome analysis: benefits and implications. *Microb Cell Fact* **3**(1):5.
- Lodmell, J.S., Gutell, R.R., and Dahlberg, A.E. (1995) Genetic and comparative analyses reveal an alternative secondary structure in the region of nt 912 of *Escherichia coli* 16S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(23):10555-10559.
- Lodmell, J.S., and Dahlberg, A.E. (1997) A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science* **277**(5330):1262-1267.
- Lunn, C.A., Fossetta, J., Murgolo, N., Zavodny, P.J., Lundell, D., and Narula, S.K. (1992) A point mutation that decreases the thermal stability of human interferon gamma. *Protein Eng* **5**(3):249-252.
- Lynch, S.R., and Puglisi, J.D. (2001) Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol* **306**(5):1037-1058.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-218.
- Mather, M.W., and Fee, J.A. (1992) Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* HB8: expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol* **58**(1):421-425.

- Matsumura, M., and Aiba, S. (1985) Screening for thermostable mutant of kanamycin nucleotidyltransferase by the use of a transformation system for a thermophile, *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* **260**(28):15298-15303.
- McGaha, S.M., and Champney, W.S. (2007) Hygromycin B inhibition of protein synthesis and ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2):591-596.
- Mendieta, J., and Gago, F. (2004) In silico activation of Src tyrosine kinase reveals the molecular basis for intramolecular autophosphorylation. *J Mol Graph Model* **23**(2):189-198.
- Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., and Berenguer, J. (2003) Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plasmid* **49**(1):2-8.
- Moreno, R., Hidalgo, A., Cava, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., and Berenguer, J. (2004) Use of an antisense RNA strategy to investigate the functional significance of Mn-catalase in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **186**(22):7804-7806.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H., and Hocino, T. (2005) In vivo directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng* **100**(2):158-163.
- Nosoh, Y., and Sekiguchi, T. (1990) Protein engineering for thermostability. *Trends Biotechnol* **8**(1):16-20.
- Ogle, J.M., Murphy, F.V., Tarry, M.J., and Ramakrishnan, V. (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**(5):721-732.
- Ogle, J.M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* **74**:129-177.

- Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A., and Kyriakidis, D.A. (2002) Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**(1):1-12.
- Park, C., and Marqusee, S. (2004) Probing the high energy states in proteins by proteolysis. *J Mol Biol* **343**(5):1467-1476.
- Park, C., and Marqusee, S. (2005) Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nat Methods* **2**(3):207-212.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., and Piston, D.W. (1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**(5):2782-2790.
- Pédélecq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**(1):79-88.
- Peitsch, M.C. (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* **24**(1):274-279.
- Perales, C., Cava, F., Meijer, W.J., and Berenguer, J. (2003) Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* **31**(22):6473-6480.
- Pfister, P., Risch, M., Brodersen, D.E., and Böttger, E.C. (2003) Role of 16S rRNA Helix 44 in Ribosomal Resistance to Hygromycin B. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(5):1496-1502.
- Phillips, G.J. (2001) Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* **204**(1):9-18.
- Piepersberg, W., Böck, A., Yaguchi, M., and Wittmann, H.G. (1975) Genetic position and amino acid replacements of several mutations in ribosomal protein S5 from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **143**(1):43-52.
- Pogliano, J., Ho, T.Q., Zhong, Z., and Helinski, D.R. (2001) Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(8):4486-4491.
- Post, L.E., Arfsten, A.E., Nomura, M., and Jaskunas, S.R. (1978) Isolation and characterization of a promoter mutant in the str ribosomal protein operon in *E. coli*. *Cell* **15**(1):231-236.

- Powers, T., and Noller, H.F. (1991) A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *EMBO J* **10**(8):2203-2214.
- Prescott, M., Nowakowski, S., Nagley, P., and Devenish, R.J. (1999) The length of polypeptide linker affects the stability of green fluorescent protein fusion proteins. *Anal Biochem* **273**(2):305-307.
- Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**(4):557-572.
- Ramírez-Arcos, S., Fernández – Herrero, L.A., and Berenguer, J. (1998a) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim Biophys. Acta.* **1396**: 215- 227.
- Ramírez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., Marin, I., and Berenguer, J. (1998b) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J. Bacteriol.* **180**: 3137–3143.
- Remington, S.J. (2006) Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr Opin Struct Biol* **16**(6):714-721.
- Rodnina, M.V., Daviter, T., Gromadski, K., and Wintermeyer, W. (2002) Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie* **84**(8):745-754.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., and Wu, L.F. (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem* **274**(19):13223-13228.
- Rosenberg, A.H., Lada, B.N., Chui, D., Lin S.W., Dunn J.J. and Studier, W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
- Ruusala, T., and Kurland, C.G. (1984) Streptomycin preferentially perturbs ribosomal proofreading. *Mol Gen Genet* **198**(1):100-104.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, H., da Costa, M.S. (2001) Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. *Methods Enzymol* **334**:302-315.

- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**(2):163-189.
- Schwarzenlander, C., and Averhoff, B. (2006) Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J* **273**(18):4210-4218.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**(13):3381-3385.
- Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, F.V. 4th, Weixlbaumer, A., Petra, S., Kelley, A.C., Weir, J.R., and Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**(5795):1935-1942.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**:223-239.
- Sieber, V., Plückthun, A., and Schmid, F.X. (1998) Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat Biotechnol* **16**(10):955-960.
- Slodowski, O., Böhm, J., Schöne, B., and Otto, B. (1991) Carboxy-terminal truncated rhulFN-gamma with a substitution of Gln133 or Ser132 to leucine leads to higher biological activity than in the wild type. *Eur J Biochem* **202**(3):1133-1140.
- Snell, F.D., and Snell, C.T. (1949) Colorimetric Methods of Analysis. *Van Nostrand, New York*.
- Spiller, B., Gershenson, A., Arnold, F.H., and Stevens, R.C. (1999) A structural view of evolutionary divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(22):12305-12310.
- Strauch, E.M., and Georgiou, G. (2007) *Escherichia coli* tatC mutations that suppress defective twin-arginine transporter signal peptides. *J Mol Biol* **374**(2):283-291.
- Sun, Q., and Margolin, W. (1998) FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **180**(8):2050-2056.
- Talkington, M.W., Siuzdak, G., and Williamson, J.R. (2005) An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature* **438**(7068):628-632.
- Tamakoshi, M., Yamagishi, A., and Oshima, T. (1995) Screening of stable proteins in an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Mol Microbiol* **16**(5):1031-1036.

- Tamakoshi, M., Yaoi, T., Oshima, T., and Yamagishi, A. (1999) An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **173**(2):431-437.
- Tamakoshi, M., Nakano, Y., Kakizawa, S., Yamagishi, A., and Oshima, T. (2001) Selection of stabilized 3-isopropylmalate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* using the host-vector system of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. **5**(1):17-22.
- Tanaka, R., Kawano, N., and Oshima, T. (1981) Cloning of 3-isopropylmalate Dehydrogenase gene of an extreme thermophile and partial purification of the gene product. *J Biochem* **89**(2):677-682.
- Thiel, D.J., le Du, M.H., Walter, R.L., D'Arcy, A., Chène, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F.K., and Ealick, S.E. (2000) Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex. *Structure* **8**(9):927-936.
- Timms, A.R., and Bridges, B.A. (1993) Double, independent mutational events in the rpsL gene of *Escherichia coli*: an example of hypermutability? *Mol Microbiol* **9**(2):335-342.
- Triman, K.L., Peister, A., and Goel, R.A. (1998) Expanded versions of the 16S and 23S ribosomal RNA mutation databases (16SMDBexp and 23SMDBexp). *Nucleic Acids Res* **26**(1):280-284.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**:509-544.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S.M., Sengupta, J., Nielsen, R.C., Nissen, P., Harvey, S.C., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003) Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* **10**(11):899-906.
- Veltman, O.R., Vriend, G., Hardy, F., Mansfeld, J., van den Burg, B., Venema, G., and Eijsink, V.G. (1997) Mutational analysis of a surface area that is critical for the thermal stability of thermolysin-like proteases. *Eur J Biochem* **248**(2):433-440.
- Vicens, Q., and Westhof E. (2002) Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem Biol* **9**(6):747-755.

- Vieille, C., and Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(1):1-43.
- Vieira, J., and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**(3):259-268.
- Vila-Sanjurjo, A., Lu, Y., Aragonéz, J.L., Starkweather, R.E., Sasikumar, M., O'Connor, M. (2007) Modulation of 16S rRNA function by ribosomal protein S12. *Biochim Biophys Acta* **1769**(7-8):462-471.
- Vilcek, J. (2003) Novel interferons. *Nat Immunol* **4**(1):8-9.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**(1):52-6.
- Waschütza, G., Li, V., Schäfer, T., Schomburg, D., Villmann, C., Zakaria, H., and Otto, B. (1996) Engineered disulfide bonds in recombinant human interferon-gamma: the impact of the N-terminal helix A and the AB-loop on protein stability. *Protein Eng* **9**(10):905-912.
- Webb, C.D., Graumann, P.L., Kahana, J.A., Teleman, A.A., Silver, P.A., and Losick, R. (1998) Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**(5):883-892.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M. Jr, Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**(6802):327-339.
- Wintrobe, P.L., Zhang, D., Vaidehi, N., Arnold, F.H., and Goddard, W.A. 3rd. (2003) Protein dynamics in a family of laboratory evolved thermophilic enzymes. *J Mol Biol* **327**(3):745-757.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**(2):221-271.
- Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N. Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**(10):1246-1251.
- Young, H.A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **16**(8):563-568.

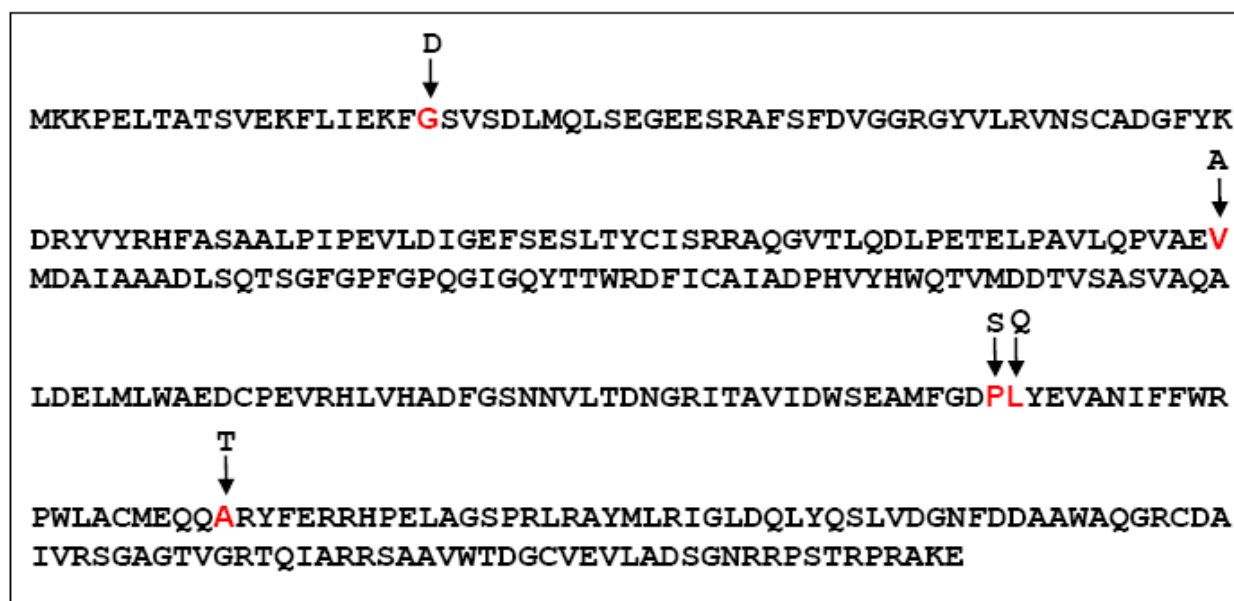
Yu, M.X., Slater, M.R., and Ackermann, H.W. (2006) Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages. *Arch Virol* **151**(4):663-679.

Zafra, O., Ramírez, S., Castán, P., Moreno, R., Cava, F., Vallés, C., Caro, E., Berenguer, J. (2002) A cytochrome c encoded by the nar operon is required for the synthesis of active respiratory nitrate reductase in *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett* **523**(1-3):99-102.

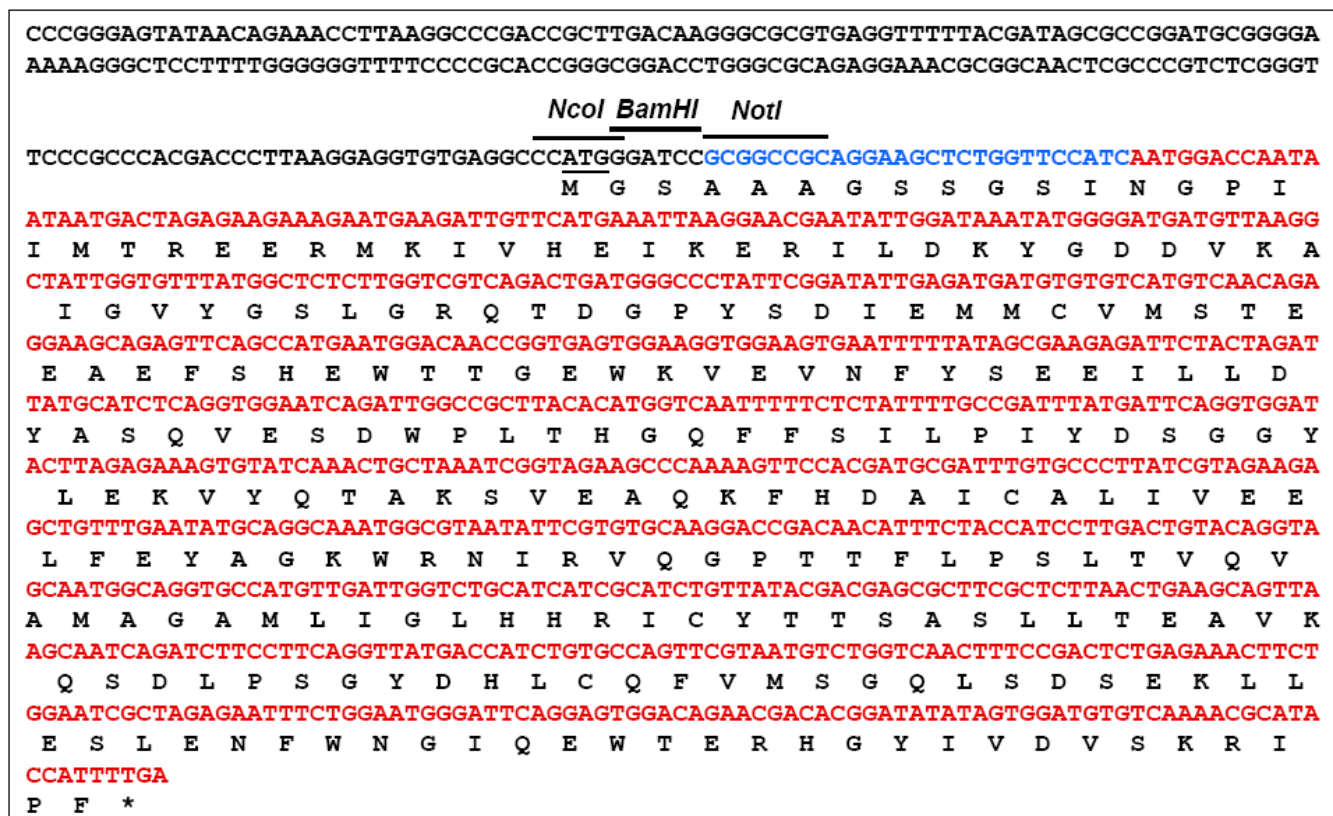
Ziesche, R., Petkov, V., Williams, J., Zakeri, S.M., Mosgöller, W., Knöfler, M., and Block, L.H. (1996) Lipopolysaccharide and interleukin 1 augment the effects of hypoxia and inflammation in human pulmonary arterial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(22):12478-12483.

Zimmer, M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* **102**(3):759-781.

ANEXO

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL GEN *hph5*

Secuencia de aminoácidos del gen *hph5*. En color rojo se indican los aminoácidos sustituidos en el gen *hph5* respecto al gen silvestre (los aminoácidos originales también se muestran).

SECUENCIA DE pNCK

Se muestra la secuencia de unión (azul) y el gen *kat* (rojo).

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral forman parte de las siguientes publicaciones:

Blas-Galindo, E., Cava, F., López-Viñas, E., Mendieta, J., and Berenguer, J. (2007) Use of a dominant rpsL allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **73**(16):5138-5145.

Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafl, Z., Blas-Galindo, E., Gómez-Puertas, P., and Berenguer, J. (2007) Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Mol Microbiol* **64**(3):630-46.

Chautard, H., Blas-Galindo, E., Menguy, T., Grand'Moursel, L., Cava, F., Berenguer, J., and Delcourt, M. (2007) An activity-independent selection system of thermostable protein variants.. *Nat Methods* **4**(11):919-921.

Cava, F., de Pedro, M.A., Blas-Galindo, E., Waldo, G.S., Westblade, L.F., and Berenguer, J. (2007) Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures *in vivo*: a tool to study extreme thermophile biology. *Enviromen Microbiol* Aceptado y pendiente de publicación.

Use of a Dominant *rpsL* Allele Conferring Streptomycin Dependence for Positive and Negative Selection in *Thermus thermophilus*[†]

Emilio Blas-Galindo, Felipe Cava, Eduardo López-Viñas, Jesús Mendieta, and José Berenguer*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 30 March 2007/Accepted 19 June 2007

A spontaneous *rpsL* mutant of *Thermus thermophilus* was isolated in a search for new selection markers for this organism. This new allele, named *rpsL1*, encodes a K47R/K57E double mutant S12 ribosomal protein that confers a streptomycin-dependent (SD) phenotype to *T. thermophilus*. Models built on the available three-dimensional structures of the 30S ribosomal subunit revealed that the K47R mutation directly affects the streptomycin binding site on S12, whereas the K57E does not apparently affect this binding site. Either of the two mutations conferred the SD phenotype individually. The presence of the *rpsL1* allele, either as a single copy inserted into the chromosome as part of suicide plasmids or in multicopy as replicative plasmids, produced a dominant SD phenotype despite the presence of a wild-type *rpsL* gene in a host strain. This dominant character allowed us to use the *rpsL1* allele not only for positive selection of plasmids to complement a kanamycin-resistant mutant strain, but also more specifically for the isolation of deletion mutants through a single step of negative selection on streptomycin-free growth medium.

Extreme thermophiles constitute models of great biological interest because of their ancestral origin, the applicability of their enzymes, and the ability of thermostable enzymes and macromolecular complexes to crystallize better than their mesophilic counterparts (18, 30, 34, 35). However, very few extreme thermophiles are presently suitable as laboratory study models due to intrinsic growth difficulties and a general absence of genetic tools required for genetic manipulations. *Thermus thermophilus* represents an exception to this rule because of (i) its ability to grow under laboratory conditions with good yields, (ii) its aerobic or facultative mode of growth, and (iii) its constitutive expression of an efficient natural competence system (7, 14). Such properties have recently allowed the development of numerous tools and methods to manipulate this bacterium at the levels comparable to those available for most mesophilic bacteria (5, 16, 17, 19, 22) yet far from those currently available for *Escherichia coli*.

One of the breakthroughs in the field of genetic analysis of *Thermus thermophilus* was provided by a method of isolation of knockout mutants based on insertion of a gene cassette (*kat*) encoding a thermostable kanamycin (Kan) nucleotidyltransferase (16). However, in spite of being a rapid method for the isolation of directed knockout mutants, the insertion of the *kat* cassette blocks further selection procedures based on this marker. Two alternative methods for the selection of marker-free deletion mutants have been published. The multistep method of Tamakoshi et al. (32) requires the isolation of a *pyrE* (encoding orotate phosphoribosyltransferase) uracil auxotroph as the parental strain and uses complementation to select for a Δ target gene::*pyrE* insertion mutant after transfor-

mation with the appropriate construct. Then, counterselection of this *pyrE* with 5-fluoroorotic acid as antimetabolite permits the subsequent isolation of Δ target gene Δ *pyrE* double mutants that can be subjected again to further selection. More recently, a “pop-in/pop-out” method based on a suicide plasmid conferring Kan resistance (pK18) was used to isolate Δ *greA* Δ *gfh1* double mutants of *T. thermophilus* (15). In this method, the insertion of the plasmid on the target by recombination is selected by Kan, and a further manual screening among thousands of colonies for spontaneous back recombinants allows the selection of the desired deletion mutant. Thus, although the first step of this pK18-based method is straightforward and can be applied to wild-type strains, the subsequent screening for antibiotic-sensitive clones requires a great deal of time and manual work. With this in mind, we hypothesized that a gene that could confer simultaneous resistance to and dependence on an antibiotic (e.g., streptomycin [Str]) could be used in a similar protocol to select the insertion and the excision of a target gene in the presence or the absence of the antibiotic, respectively, without the requirement of any tedious manual screening.

Str inhibits bacterial protein synthesis through binding to multiple structural elements of the 30S ribosomal subunit, including the S12 protein and the 16S rRNA helices 1, 18, 27, and 44 (1). Although Str-resistant (SR) and Str-dependent (SD) mutants of *E. coli* have been known for a long time, the molecular details of the interaction of the antibiotic with its binding site in the bacterial ribosome have been described only recently after the resolution of Str-30S complexes of *T. thermophilus* (1). Most SR and SD mutants of different bacterial groups, including *T. thermophilus* (8), present amino acid substitutions in their S12 ribosomal protein, which in *E. coli* is encoded by the *rpsL* gene. Therefore, we hypothesized that it could be possible to isolate SD alleles of the *rpsL* gene of *T. thermophilus* that could fulfill our requirements for a selectable and counterselectable gene marker. In fact, SR and SD alleles of the *rpsL* gene of *T. thermophilus* have been described previously (8), and DNA from SR strains of *T. thermophilus* are

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 91 4978099. Fax: 34 91 4978087. E-mail: jberenguer@cbm.uam.es.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 29 June 2007.

routinely used for the functional analysis of the natural competence system of this organism in Kan-resistant genetic backgrounds (7), thus supporting the feasibility of this hypothesis.

Here we describe the isolation of an *rpsL* allele (*rpsL1*) encoding a double mutant S12 protein that confers an unexpectedly dominant SD phenotype in *T. thermophilus*. We show that this allele can be used as a positive selection marker for suicide and replicative plasmids alternative to and compatible with the widely used Kan resistance gene (*kat*) and also as a negative selection marker for the isolation of marker-free deletion mutants of *T. thermophilus* in a single-step procedure. The likely molecular details of this dominant SD phenotype are also discussed based on the models of the described structures of the *T. thermophilus* ribosome (1, 23).

MATERIALS AND METHODS

Strains, growth conditions, and transformation. *T. thermophilus* HB27 was a generous gift of Y. Koyama. The strain *T. thermophilus* HB27c is a facultative anaerobe obtained by transfer of the nitrate conjugative element (3) to the HB27 strain (27). Insertional *narC::kat* (39), *phoA::kat* (21), and *greA::kat* (15) mutants are derivatives of the HB27c strain in which the corresponding genes were knocked out by insertion of a gene (*kat*) coding for a thermostable resistance to Kan (16). The *E. coli* strain DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* ϕ 80 *lacZ* Δ M15 *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) (10) was used for genetic constructions. *E. coli* and *T. thermophilus* were grown in LB at 37°C and in *Thermus* broth (TB) (25) at 70°C, respectively.

Transformation of *T. thermophilus* was achieved by natural competence on growing cells (5, 13), whereas standard protocols were used to transform *E. coli* (10). Selection was carried out on 1.5% (wt/vol) agar plates with Str (different concentrations), Kan (30 mg/liter), and/or ampicillin (Amp; 100 mg/liter).

Isolation and cloning of the *rpsL1* gene. Identical amounts of total DNA preparations from individual colonies of spontaneous mutants of *T. thermophilus* that grew on TB plates with Str (100 mg/liter) were used to transform competent cultures of the wild-type strain. Total DNA preparations of individual colonies that rendered the highest number of transformants on plates with Str (100 mg/liter) were used as templates for the amplification by PCR of a 759-bp DNA fragment containing sequences from positions -294 to +445 with respect to the GTG start codon of the *rpsL* gene (*T. thermophilus* HB27 genome code TTC1333) (11). Primers O-str1 (5'-AAAACATATGTCCAGGCGCTCCA-3') and O-str2 (5'-AAAACATATGACGGACCTCTGCT-3'), each containing an NdeI site (underlined), were used for this amplification. Identical amounts of the PCR products were used to transform *T. thermophilus* HB27, and transformants that produced the highest number of colonies on plates with Str were selected for further studies. The comparison of the sequence of this allele (*rpsL1* thereafter) with that of the wild type revealed two A-to-G transitions (positions +140 and +169) that produced the amino acid replacements K47R and K57E. To analyze the individual role of each amino acid substitution, a 470-bp 5'-end fragment (positions -294 to +166) and a 312-bp 3'-end fragment (+143 to +445) of *rpsL1* were amplified with primer pairs O-str1/O-str6 (5'-CCACCTTACGGAGCGC CGAGTTGG-3') and O-str5 (5'-CCAACTCGCGCTCCGTAAGGTGG-3') and O-str2, respectively, and the corresponding PCR products were used to transform the wild-type strain. The colonies that grew on TB plates with Str (100 mg/liter) were analyzed for the presence of each mutation by sequencing the whole *rpsL* gene once amplified by PCR with primers O-str1 and O-str2.

Plasmid construction. DNA isolation, plasmid construction, and restriction analysis were performed as described elsewhere (28). Amplification of the *rpsL* gene was carried out by PCR with *Tth* or *Pfu* DNA polymerases (BIOTOOLS B & M, Madrid, Spain) and primers O-str1 and O-str2. The insertion of this PCR fragment at the NdeI site of plasmid pUC18 rendered the pS18a and pS18b constructs that differ only in the orientation of the *rpsL1* gene (see map in Fig. 2A). The presence of the suicide plasmids in the chromosome of transformed cells of *T. thermophilus* was detected by PCR with primer pairs Ostr1/M13reverse (5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'), Ostr1/Ostr8 (5'-GATGAAGGCCGTG ACCAG-3'), and O-132pUC (5'-GGGGCTGGCTTAACATAG-3')/Ostr8.

Plasmid pMS18 is a derivative of pS18a that carries a replicative origin functional in *Thermus* spp. (6). For its construction, the pMK18 replicon was amplified by PCR with primers O-repNde2d (5'-CTGTTTCATATGCCTCAGTTGA-3') and O-repNder (5'-GGGACCATATGCCCCCTGGA-3'), both containing

NdeI sites (underlined), and ligated into pS18a (see map in Fig. 2A). The *bgaA* and *phoA* genes encode a thermostable beta-galactosidase (β gal) (14) and a hyperalkaline phosphatase (2, 21), respectively. The *narC* and *ghf1* genes encode a periplasmic cytochrome *c* that constitutes the fourth subunit of the respiratory nitrate reductase (40) and the transcription elongation factor Gfh1 (15) of *T. thermophilus*, respectively. Derivatives of pS18a and/or pMS18 carrying the *narC*, *bgaA* (22), and *phoA* (22) genes under the control of the nitrate reductase promoter (*nar_p*) (22) were obtained by cloning the respective genes between the XbaI and HindIII restriction sites of the plasmids. Derivatives of pS18a and pMS18 containing the *ghf1* gene under the control of its own promoter (15) were obtained by cloning the gene between the restriction sites EcoRI and SalI of both plasmids.

Induction of *nar_p* and complementation assays. Cells were grown at 70°C in TB under aerobic conditions in a rotational shaker bath (150 rpm), and transcription from the nitrate reductase operon promoter (*nar_p*) was activated by addition of KNO₃ (40 mM) and the simultaneous arrest of the shaker. Under such static growth conditions, the low solubility of O₂ at 70°C and its rapid consumption by the cells make the culture anoxic in a very short time (4, 22). Cells were incubated for 4 h at 70°C in such static conditions before being processed. The presence of the *kat* gene inserted into its target in the complementation experiments was confirmed by PCR with primer pairs FPPnarDIR (5'-CTGGACCAGGTGGGCGCA-3') and KAT4 (5'-AGAAATTCCTAGCG AT-3') for the *narC::kat* mutant and O-API (5'-CTACGTCACCGAGTCCA-3') and KAT4 for the *phoA::kat* mutant.

The BgaA activity of soluble cell extracts of the *T. thermophilus* cultures was assayed at 70°C with *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as chromogenic substrate by following previously described methods (22). The periplasmic hyperalkaline phosphatase (PhoA) of similar soluble cell extracts was measured with *p*-nitrophenyl-phosphate as described previously (22). The activity of the nitrate reductase was detected by the production of nitrite per min and mg of protein (31). Detection of Gfh1 on complete cell extracts from exponential cultures of *T. thermophilus* was carried out by Western blotting with specific rabbit antiserum as described previously (15).

Isolation of deletion mutants. Plasmid pS18 Δ narC is a derivative of pS18a carrying upstream and downstream DNA regions of the *narC* gene (38) that was used to transform the wild-type strain. A group (around 50) of small-sized transformant colonies that grew on TB plates with Str (100 mg/liter) were coinoculated in 10 ml of TB medium and incubated for 2 h at 70°C before 50- μ l aliquots of the concentrated and the 10⁻¹ dilution of the cell suspension were plated onto TB plates without Str. As the *rpsL1* allele confers a dominant SD phenotype, only those colonies in which this allele was deleted by back recombination could grow on these plates. The Str-sensitive clones were then assayed for the loss of nitrate reductase activity and further analyzed for the absence of the *narC* target gene by PCR with primers FPPnarDIR and O27-32 (5'-CCCA GCTCGCCCGCGG-3').

Bioinformatic analysis. Crystal structures of the S12 wild-type protein and their 16S rRNA chain-contacting residues were obtained from the crystallographic structures of the ribosomal 30S subunit for comparative geometrical analysis. Calculation of the variation of the dihedral angles of the 16S rRNA phosphates trace and the S12 protein C α atoms backbone were performed with the open (Protein Data Bank entry 1J5E) (37), closed tRNA/mRNA-bound (Protein Data Bank entry 1N32) (23), and Str-bound (Protein Data Bank entry 1FJG) (1) forms as described previously (20). Dihedral angles and root mean square deviation values between structures were calculated using the Insight II package. Plots and statistics of the three pairwise comparisons were made with SigmaPlot.

Building of three-dimensional structures for K47R and K57E mutants of S12 protein was performed using standard homology-based modeling procedures. Briefly, models were made using the SWISS-MODEL server (9, 24, 29). The structural quality was verified using WHAT-CHECK (12) of the WHAT IF package program (36). In order to perform a first geometry optimization and correct atomic clashes, the energy of the obtained structure was minimized with the implementation of the GROMOS 43B1 force field of the DeepView program (9) using 500 steps of steepest descent minimization and 500 steps of conjugate-gradient minimization.

RESULTS

Isolation and characterization of an *rpsL* gene allele conferring an SD phenotype. We designed a protocol to isolate a spontaneous *rpsL* mutant allele (*rpsL1* thereafter) able to produce a high number of *T. thermophilus* colonies on plates with

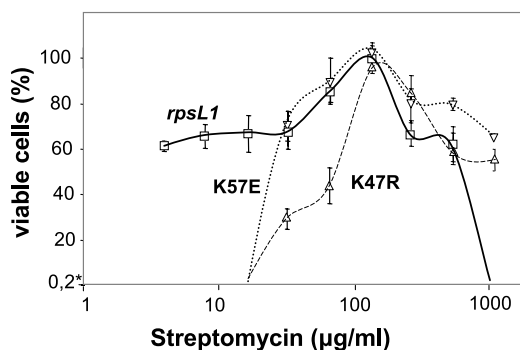


FIG. 1. Str dependence of the *rpsL1* mutant and its single mutant derivatives. Overnight cultures of the wild-type strain grown on TB and of the *rpsL1*, K47R, and K57E mutants grown with 100 mg/liter of Str in the same medium were diluted (10^{-5} and 10^{-6}) and plated (100 μ l) on TB plates with increasing Str concentrations. After 48 h at 70°C, the number of colonies that grew in each plate was counted and is represented as the percentage of viable cells with respect to their respective maximum values. The data represent the mean values and the standard deviations of two independent assays. The y-axis minimum value (0.2%) is limited by the sensitivity of the assays.

Str (Materials and Methods). When dilutions of these transformant colonies containing around 500 colonies were plated off, no growth was detected in the absence of Str, whereas colonies were detected on plates containing between 4 and 512 mg/liter of Str, with the maximum at 100 mg/liter and no growth at 1,024 mg/liter (Fig. 1). The parental strain was unable to produce colonies even at the lowest concentration of Str used. We concluded that the *rpsL1* allele actually confers an SD phenotype to *T. thermophilus*.

The *rpsL1* allele encodes a mutant S12 ribosomal protein with two amino acid substitutions, K47R and K57E (numbers correspond to the *T. thermophilus* S12 amino acid sequence). Sequence alignments of S12 proteins from other bacteria, including *E. coli* S12, revealed that K47 (corresponds to K43 in *E. coli* S12) is a conserved amino acid in all the bacterial S12 sequences analyzed. By contrast, the K57 residue corresponds to an arginine in most of the S12 proteins, including *E. coli* R53.

Single K47R and K57E mutants present SD phenotypes. To examine the individual role of each mutation of the *rpsL1* allele in the SD phenotype of *T. thermophilus*, we took advantage of the highly efficient natural competence system of this organism and transformed the wild-type *T. thermophilus* strain with identical amounts of two PCR-amplified fragments of the *rpsL1* allele, coding for either the K47R or K57E mutation (Materials and Methods). Selection on plates with Str (100 mg/liter) revealed a similar number of transformants with both fragments (not shown), suggesting that each individual mutation confers an SD phenotype. This was further confirmed by sequence analysis of the *rpsL* gene, which was PCR amplified using genomic DNA derived from a number of colonies from each transformation group.

In order to compare the phenotype conferred by each mutation with that of the double mutant, we inoculated identical numbers of cells with each mutation on plates containing increasing concentrations of Str. As shown in Fig. 1, the K47R and the K57E single mutants showed a clear SD phenotype,

although they required higher antibiotic concentrations to grow than did the double K47R K57E mutant. In fact, none of the single mutants grew at concentrations of Str lower than 32 mg/liter. The experiments also revealed that the K47R mutant required higher antibiotic concentrations than the K57E mutant to show an efficient growth; at 32 mg/liter, this strain showed only 30% of its maximum number of viable cells, reached at 100 mg/liter, compared to the 70% viability shown by the K57E strain. On the other hand, the individual mutants grew efficiently even at 1,024 mg/liter, a concentration on which the double mutant did not show a detectable growth.

We also compared the growth rates of each mutant with that of the wild-type strain in liquid medium. In exponential phase, all mutants grew in TB with Str (100 mg/liter) with longer doubling times (55 to 60 min), whereas the wild-type strain grew with doubling times around 40 min in the absence of the antibiotic.

Construction of suicide vectors based on the *rpsL1* allele. Following PCR amplification, the *rpsL1* allele (including its promoter) was cloned into pUC18, rendering plasmids pS18a and pS18b, each carrying this gene in opposite orientations with respect to the *lacZp* promoter (Fig. 2A). Both plasmids ensured Amp resistance and had the multicloning site and the α -LacZ complementation system of their parental plasmid to facilitate the cloning procedures in *E. coli*. However, neither the pS18a nor the pS18b plasmid conferred the SR or SD phenotype to *E. coli* (not shown) as we expected based on the differences in amino acid sequences between the S12 proteins of *E. coli* and that of *T. thermophilus* (8). On the other hand, these plasmids could not replicate in *Thermus* spp. because of the absence of an appropriate replication origin. Thus, the only way to provide any detectable Str-related phenotype in *T. thermophilus* was through its integration into the chromosome by homologous recombination.

In order to analyze if this was the case, identical amounts (200 ng) of each plasmid were used to transform the wild-type strain, and selection was carried out on plates with different concentrations of Str. As shown in Fig. 2B, transformation with pS18a and pS18b allowed the growth on plates with Str (100 mg/liter) of a much higher number of colonies than the number of spontaneous mutants that grew on the untransformed control plates. In all cases, plasmid pS18a rendered more transformed colonies than pS18b. These data suggest that the plasmids were most likely inserted into the chromosome of the receptor strain after transformation and provided the host with the capability of growing on Str. At higher Str concentrations, the number of colonies decreased, while the number of spontaneous mutants remained more or less constant (frequency of around 10^{-6} to 10^{-7}), even at the highest concentration assayed in these experiments (600 mg/liter). Moreover, whereas most of the untransformed colonies that grew on the control plates were large (as with the wild-type strain in the absence of the antibiotic), those that grew after transformation with pS18a presented a number of "large" colonies similar in size and number to that grown on the control plates and a much higher number of "small" colonies (not shown). This observation suggests that integration of pS18a into the chromosome produces a slow-growth phenotype similar to that shown by the *rpsL1* mutant. In fact, when these two colony types from the pS18a transformation were assayed for their ability to grow in the

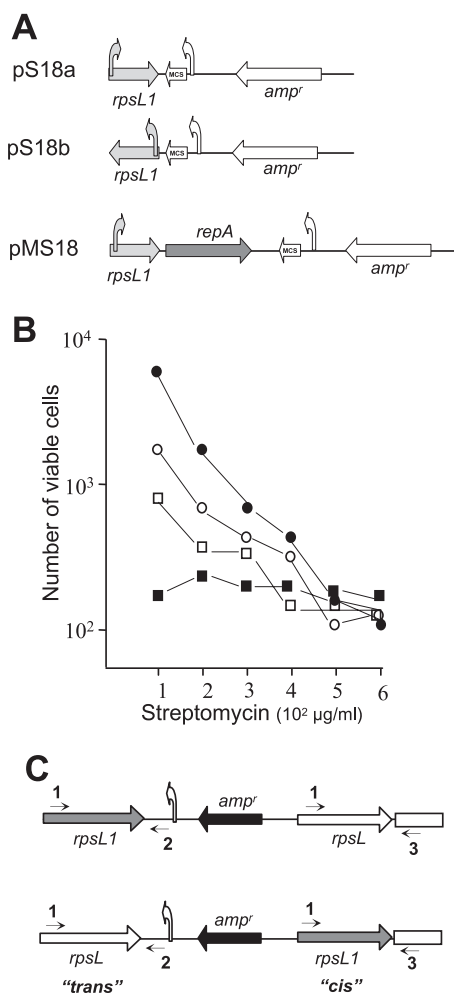


FIG. 2. Suicide and replicative plasmids based on the *rpsL1* allele. (A) Structure of suicide (pS18a and pS18b) and replicative (pMS18) plasmids based on the *rpsL1* allele. (B) The number of colonies that grew on TB plates containing the indicated concentrations of Str before (filled squares) or after transformation with identical amounts of pS18a (open circles), pS18b (open squares), or pMS18 (filled circles). (C) Two putative results of the integration of pS18a into the *rpsL* target (white arrows) through recombination with the *rpsL1* allele (gray arrows). Approximate positions of the *amp^r* resistance gene (black) and the *lacZp* (vertical arrows) are indicated. Small arrows represent positions of primers O-str1 (1), M13-rev (2), and O-str8 (3).

absence of Str, most (95%) of the large colonies were SR, a percentage similar to that shown by the large, spontaneous mutant colonies grown on untransformed control plates. By contrast, all the small-sized colonies checked were SD.

The results described above supported the idea that the *rpsL1* allele was inserted into the chromosome after transformation with pS18a, but they did not allow us to discriminate whether the whole plasmid remained linked to the chromosome after recombination or was further deleted through a back recombination. To distinguish between these two possibilities, PCR amplification assays were carried out on total DNA from 10 small-sized colonies transformed with pS18a. As positive amplification with primers Ostr-1 and M13-reverse (labeled 1 and 2 in Fig. 2C) was detected in all of them, we concluded that the plasmid was still present in the chromo-

some of all the transformants assayed. Consequently, these colonies had two copies of the *rpsL* gene, the wild type and its *rpsL1* allele (Fig. 2C), leading to the conclusion that in these pS18a-transformed cells, the *rpsL1* allele was dominant over its parental wild-type *rpsL* gene.

We subsequently analyzed whether the mutant S12 protein was expressed in these colonies from the *rps* operon (in “cis”) or from the copy generated after plasmid integration (in “trans”) (Fig. 2C) by sequencing the “cis” copy after PCR amplification with primers labeled 1 and 3 in Fig. 2C and the “trans” copy after PCR amplification with primers labeled 1 and 2. The two mutations corresponding to *rpsL1* were identified in the sequence of the “cis” copy of all the colonies analyzed. Interestingly, the cells transformed with pS18a grew with doubling times indistinguishable from that of the *rpsL1* mutant.

Construction of replicative vectors. To analyze if the *rpsL1* allele also was an appropriate selection marker when being expressed in a multicopy plasmid, we inserted the replicative origin of pMK18 (5, 6) into pS18a. As its parental pS18a plasmid, the new construct (pMS18) (Fig. 2A) could be selected in the presence of Amp in *E. coli* and of Str in *T. thermophilus*. As expected from its higher copy number per cell, selection of pMS18 on Str rendered 5- to 10-fold more colonies than those obtained by transformation with similar concentrations of its parental pS18a suicide vector (Fig. 2B). Moreover, the transformant colonies were unable to grow on plates without Str. Therefore, the cells transformed with pMS18 are SD, despite the presence of a chromosomal wild-type *rpsL* copy as revealed by PCR (primers 1 and 3 in Fig. 2C). Thus, the *rpsL1* allele was also dominant over its parental wild type, even when expressed from the multicopy plasmid. Accordingly, the growth rate of cells transformed with pMS18 was similar to that of the *rpsL1* mutant.

We compared the features of two plasmids, pMK18 (5) and pMS18, side by side. The copy numbers of both plasmids were similar, as could be evaluated by the total quantity of each plasmid purified from the same amount of cells transformed with each of them. The stability of pMS18 was also assayed through the analysis of the restriction map from colonies obtained after 30 generations of growth in liquid TB with Str (100 mg/liter): our data show that around 90% of the plasmids preserved the same restriction pattern as the original pMS18, supporting that the plasmid was stable enough to be used as a cloning vector.

pS18a and pMS18 as cloning vectors. The results described above suggested that plasmids pS18a and pMS18 could be used as integrative (single-copy) and replicative (multicopy) cloning vectors for *T. thermophilus*, respectively. To check this, the *bgaA* gene, encoding a thermostable beta-galactosidase, was cloned into both plasmids to render pS18βgal and pMS18βgal. As the expression of the cloned *bgaA* gene was under the control of the promoter from the respiratory nitrate reductase (*nar_p*) (22), we used as a host the facultative strain *T. thermophilus* HB27c that contains the transcription factors required for the expression of this promoter under appropriate conditions (26).

In a typical experiment, 18 out of 30 SD colonies transformed with pS18βgal analyzed showed a beta-galactosidase activity five- to sevenfold higher than that of the basal level of

untransformed cells (Fig. 3A). By contrast, all the SD colonies transformed with pMS18 β gal that were assayed expressed the thermostable beta-galactosidase up to 15- to 20-fold more than did untransformed cells (Fig. 3A). These findings allowed us to conclude that pS18a and pMS18 indeed can be used in *T. thermophilus* as single- and multicopy cloning vectors, respectively.

Complementation of Kan-resistant mutants of *T. thermophilus* by pS18a and pMS18 derivatives. As mentioned in the introduction, the use of the *kat* gene for the isolation of insertion mutants represents the easiest method for the functional analysis of genes in *T. thermophilus*. However, a complementation experiment with such Kan-resistant mutants indeed is a difficult task. Due to this, we assayed the capability of pS18a and pMS18 to complement three different Kan-resistant insertion mutants of *T. thermophilus*.

For this purpose, the genes encoding a cytochrome *c* (NarC) that constitutes the fourth subunit of the respiratory nitrate reductase (*narC*), the hyperalkaline phosphatase (*phoA*), and the Gfh1 transcription elongation factor (*gfh1*) of *T. thermophilus* were cloned into pS18a and pMS18, and the constructs were subsequently used to transform the respective *narC::kat*, *phoA::kat*, and *gfh1::kat* mutants. Selection was done on TB plates with Kan and Str to avoid the replacement of the *kat* gene from the target. The colonies were further analyzed by PCR for the presence of the *kat* insertion (Materials and Methods) and for the recovery of the respective wild-type phenotypes (β gal or PhoA activities or Gfh1 presence).

Figure 3B and C show the results of such complementation experiments. As can be observed, complementation of the nitrate reductase with the *narC* gene was only partial for both plasmids compared to the activity of the wild-type strain, although cells transformed with the pMS18 derivative (pM) reached higher activity than those transformed with the pS18a derivative (pS). As the growth rate of cells transformed with either of these plasmids was much lower than that of the wild type, we assumed that part of the difference in activity with respect to the wild type was due to the growth-dependent lower induction rates in the mutants. By contrast, complementation of the *phoA::kat* mutant with *phoA* derivatives of both plasmids resulted in activities similar to that of the wild type (Fig. 3C), most likely because of the early saturation of the secretion machinery that translocates PhoA to periplasm (2). Finally, complementation of the *gfh1::kat* mutant with the corresponding pS18a derivative allowed the expression of Gfh1 in three out of four colonies checked by Western blotting, although the expression levels were not identical in all of them (Fig. 3D). By contrast, expression from the pMS18gfh derivative produced wild-type levels of proteins in all the colonies assayed (Fig. 3D).

In addition, it is worthy to note that complementation of the three mutations with the pS18a derivatives occurs in about 70 to 80% of the SD transformant colonies, whereas 100% of the colonies showed the expected complementation when transformed with the pMS18 derivatives.

One-step selection of deletion mutants with pS18a. Taking advantage of the dominant SD phenotype conferred by the *rpsL1* allele in plasmid pS18a, we hypothesized that this property could be useful for development of a rapid method for the positive selection of deletion mutants of a target gene. In the

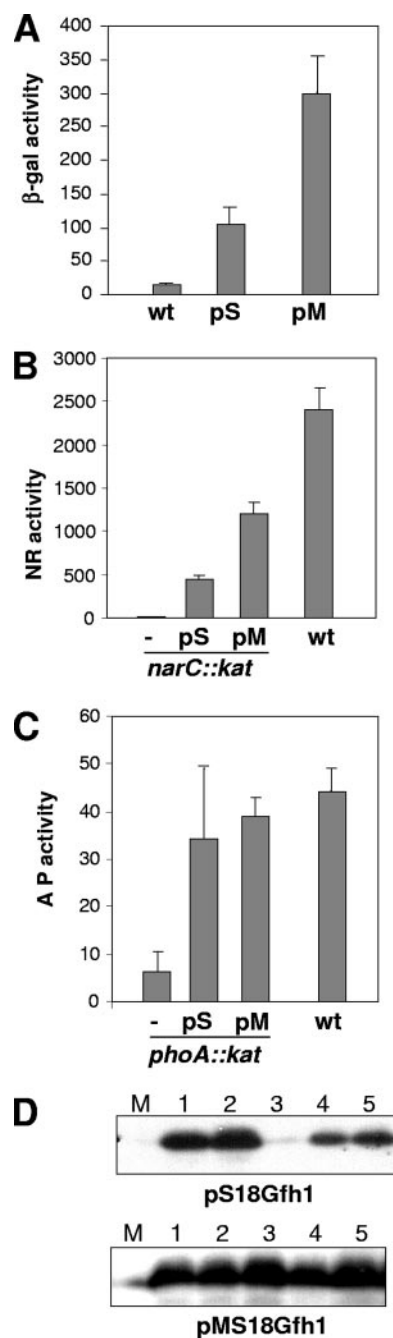


FIG. 3. Applications of pS18a and pMS18 on Kan-sensitive and -resistant strains. (A) Expression of BgaA. Shown is the beta-galactosidase activity in Miller units of *T. thermophilus* HB27c before (wild type [wt]) or after transformation with pS18-bgaA (pS) and pMS18-bgaA (pM). (B) Nitrate reductase (NR) activity of the *T. thermophilus* HB27c *narC::kat* mutant before (-) or after transformation with plasmid pS18narC (pS) or pMS18narC (pM). The activity is expressed as nmol of nitrite produced per min and mg of protein. (C) Hyperalkaline phosphatase activity in Miller units of a *T. thermophilus* HB27c *phoA::kat* mutant before (-) or after transformation with pS18phoA (pS) or pMS18phoA (pM). The activity of the wild-type strain (wt) is also shown in panels B and C. (D) Western blot against Gfh1 of colonies (lanes 2 to 5) of a *gfh1::kat* mutant transformed with the indicated plasmids. Lanes M and 1 correspond to the mutant and the wild-type strains, respectively. The data presented in panels A to C correspond to mean values and standard deviations of triplicate samples from four to six independent assays.

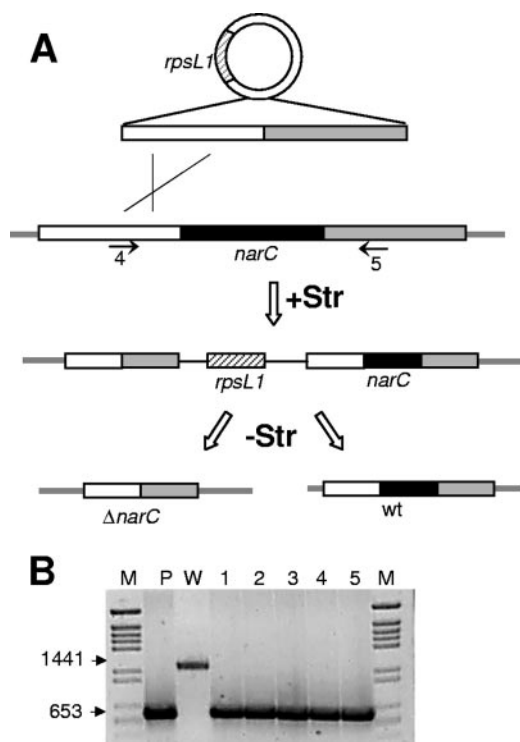


FIG. 4. Isolation of deletion mutants by counterselection of the *rpsL1* allele. (A) Scheme showing the protocol followed to isolate deletion mutants of the *narC* gene. Insertion of pS18 Δ narC derivative by homologous recombination is selected on plates with Str (+Str), and the plasmid presence is subsequently counterselected on plates without the antibiotic (–Str). Arrows labeled 4 and 5 correspond to primers FPPnarDIR and O27-32 used in panel B. (B) PCR with primers 4 and 5 of panel A on total DNA from colonies (lanes 1 to 5) selected from panel A that did not show nitrate reductase activity. Lanes P and W correspond to the PCR amplification of the pS18 Δ narC plasmid and to total DNA of the wild-type strain, respectively. Lane M corresponds to DNA size markers. Lateral numbers indicate the sizes in base pairs of the PCR products.

method proposed, the insertion into the chromosome of a pS18a derivative containing upstream and downstream homologous regions around a target gene, *narC* in this case, is selected on plates containing Str, and its deletion by back recombination is further selected by plating on a medium without the antibiotic. This is illustrated in Fig. 4 with the isolation of a Δ narC mutant, in which the insertion of the pS18 Δ narC construct was selected on plates with Str. Then we coinoculated around 50 transformant colonies in a single tube with 10 ml of TB, and after 2 h at 70°C, the cell mix was plated on TB plates without the antibiotic. Under these conditions, less than 1% of the cells grew, compared to the percentage that grew on TB with Str. Moreover, these colonies were sensitive to Str, supporting that they have lost the *rpsL1* allele. The analysis of a number of these Str-sensitive colonies revealed that around half of them lacked any detectable nitrate reductase activity, as was expected for mutants defective in *narC* (40). Further PCR assays on five of these nitrate reductase-negative colonies revealed that all of them were Δ narC mutants, as demonstrated by the amplification of a 653-bp fragment instead of the 1,441 bp expected for a wild-type strain (Fig. 4B). In conclusion,

around half of the Str-sensitive colonies isolated by this protocol carried the expected gene deletion. This one-step procedure represents the fastest and the most straightforward method described to date to obtain deletion mutants in this thermophilic bacterial model.

DISCUSSION

Thermus spp. constitute a major bacterial model in structural biology and in biotechnology, and high-resolution structures of ribosomes (30) or RNA polymerase (34) are clear examples of this. However, there are still few genetic tools and, specifically, a great limitation in selectable markers to elucidate structure-function relationships in these organisms. Here we describe a dominant gene marker encoding a double mutant S12 protein from *T. thermophilus* HB27 that confers not just resistance to, but dependence on, Str, making its use feasible for either positive or negative selection.

As the isolation of the *rpsL1* allele was carried out in a single step, the presence of two mutations in the same gene would be unexpected because of its low probability (10^{-12} to 10^{-14}) unless it occurred sequentially through some kind of effective selection. The most likely selective force could be a requirement for a secondary compensatory mutation that could alleviate a strong growth defect produced by a primary mutation. In this sense, it is interesting to compare the *rpsL1* allele of *T. thermophilus* with the SD mutants of *E. coli* described by Timms and Bridges (33). These authors found that double *rpsL* mutants appeared with an unexpectedly high frequency among spontaneous or UV-induced SD mutants and suggested the existence of a transient hypermutability state of the organism that allowed the appearance of compensatory mutations during the first generations of a single-mutant strain. Interestingly, the authors distinguished between “primary” and “ancillary” mutations, in reference to the appearance of the former in some single SD alleles, whereas the latter were essentially found as accompanying mutations of the former. However, the putative individual effects of such ancillary mutations on the Str phenotype were not analyzed in detail. By contrast, in this work we have been able both to separate mutations in *T. thermophilus* by transformation with *rpsL1* fragments and to observe that each individual mutation confers an independent SD phenotype, although both required higher Str concentrations than the *rpsL1* double mutant to grow (Fig. 1). Therefore, we could not deduce which of these two SD mutations would be considered “primary” by this criterion. However, the comparison with the *E. coli* S12 protein favors the K47R replacement as the primary mutation: the position K43 in *E. coli*, equivalent to K47 in *T. thermophilus*, is a frequent target for a primary (K43E in *E. coli*) SD mutation, whereas the R53 residue in *E. coli*, corresponding to K57 in *T. thermophilus*, has been described as the target for different ancillary mutations (R53S, R53C, and R53L in *E. coli*) bound to the P90L primary SD mutation in *E. coli* (33). Therefore, it is likely that the *rpsL1* allele was selected by the incorporation of a compensatory mutation (K57E) during the first division cycles on a K47R mutant.

The structural reasons by which these mutations, and especially K57E, confer a SD phenotype are difficult to define due to the huge number of interactions implicated. As shown else-

where (see Fig. S1A and S1B in the supplemental material), evidence for a global displacement of residues 1490 to 1493 of the 16S RNA close to the Str binding site were detected from backbone dihedral trace comparisons between the “open,” the “closed,” and the “Str-bound” structures of the 30S ribosomal subunit of *T. thermophilus*, supporting that Str fixes the structure in a closed-like conformation. The K47R and K57E mutations independently affect the global electrostatic and steric configuration of this region, pushing out the 16S RNA in such a way that it seems difficult to form a “closed” functional conformation (see Fig. S1C and S1D in the supplemental material). In this scenario, the presence of Str could partially compensate for this, allowing the structure to recover its capability to accommodate the conformational changes required to be functional.

Whatever the reason underlying the SD phenotype, the most surprising result from this work was the dominant character of the *rpsL1* allele over its wild-type *rpsL* parental gene when both are present in the cell. This dominant character was shown when the *rpsL1* allele was expressed as a single copy in the chromosome because of the integration of either the suicide pS18a plasmid or its derivative pS18ΔnarC. In the first case, the *rpsL1* allele was expressed as part of its natural operon (“cis” in Fig. 2C) in all the colonies checked. On the other hand, the pS18ΔnarC and pMS18 plasmids also confer an SD phenotype, despite the presence of a wild-type *rpsL* gene expressed from its operon. In consequence, we deduced that the *rpsL1* allele produces a dominant SD phenotype, independently of being expressed as part of its operon (pS18a), from another locus in the chromosome (pS18ΔnarC) or from a plasmid (pMS18).

The reason for this dominance cannot be presently understood. In fact, the presence of both wild-type and mutant ribosomes could be expected in a strain carrying the *rpsL* and the *rpsL1* alleles, and consequently, such cells could be expected to grow either with or without Str. As this was not the case, the dominant SD phenotype is necessarily related to some kind of interference during the synthesis of the wild-type ribosomes in the presence of the mutant S12 protein.

On a practical level, the *rpsL1* allele has been successfully proven as a positive selection marker alternative to the *kat* gene for plasmid construction, allowing the expression of genes either on Kan-sensitive or Kan-resistant genetic backgrounds. In both cases, expression of the selected genes as a single copy was possible only in 70 to 80% of the SD transformant colonies. Such a percentage was actually expected because of putative integration into the chromosome through partially homologous regions, which could result in nonfunctional genes, or because of double recombination events that could result in the replacement of the *rpsL* gene by its *rpsL1* allele with the consequent plasmid excision. By contrast, complementation success reached nearly 100% of the SD transformant colonies with the replicative plasmid that does not have to recombine to be maintained in the cell. In conclusion, the *rpsL1*-based plasmids constitute a new genetic tool for *T. thermophilus* useful for the complementation of Kan-resistant strains.

However, the most promising application of the *rpsL1* allele as a genetic tool is its counterselectable character in Str-free growth medium. This allowed us to develop a fast and straightforward method for the isolation of deletion mutants of a

target gene in a single step. The procedure has been applied here to the isolation of ΔnarC mutants in order to compare it with the procedures of Tamakoshi et al. (32) that we used previously to isolate a ΔnarC mutant (38). This method requires the production of a ΔpyrE mutant of the parental strain prior to the use of uracil complementation on mineral medium to isolate Δtarget gene::pyrE mutants by double recombination, which finally must be treated with fluoroorotic acid to counterselect the presence of the pyrE gene. The method that we propose here requires only two TB plates with and without Str and a single-plasmid construct to obtain the required deletion mutant. The new method will greatly facilitate the structure-function studies in this important bacterial model.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by grants of codes BIO2004-02671, cofunded by the Ministerio de Educación y Ciencia and the European Union, and S0505/PPQ/0344, from Comunidad Autónoma de Madrid. Financial support of Fundación Ramón Areces to CBMSO is acknowledged.

The bioinformatics support of Biomol Informatics S.L. (<http://bioinfo.es>) and the critical review of this article by Oleg Laptenko and Tony Barsotti are also acknowledged.

REFERENCES

1. Carter, A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**:340–348.
2. Castan, P., O. Zafra, R. Moreno, M. A. de Pedro, C. Valles, F. Cava, E. Caro, H. Schwarz, and J. Berenguer. 2002. The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidence from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. *Extremophiles* **6**:225–232.
3. Cava, F., and J. Berenguer. 2006. Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:97–100.
4. Cava, F., M. A. de Pedro, H. Schwarz, A. Henne, and J. Berenguer. 2004. Binding to pyruvated compounds as an ancestral mechanism to anchor the outer envelope in primitive bacteria. *Mol. Microbiol.* **52**:677–690.
5. de Grado, M., P. Castán, and J. Berenguer. 1999. A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **42**:241–245.
6. de Grado, M., I. Lasa, and J. Berenguer. 1998. Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**:51–57.
7. Friedrich, A., C. Prust, T. Hartsch, A. Henne, and B. Averhoff. 2002. Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:745–755.
8. Gregory, S. T., J. H. Cate, and A. E. Dahlberg. 2001. Streptomycin-resistant and streptomycin-dependent mutants of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **309**:333–338.
9. Guex, N., and M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714–2723.
10. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
11. Henne, A., H. Bruggemann, C. Raasch, A. Wiezer, T. Hartsch, H. Liesegang, A. Johann, T. Lienard, O. Gohl, R. Martínez-Arias, C. Jacobi, V. Starkuviene, S. Schlenczek, S. Dencker, R. Huber, H. P. Klenk, W. Kramer, R. Merkl, G. Gottschalk, and H. J. Fritz. 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* **22**:547–553.
12. Hooft, R. W., G. Vriend, C. Sander, and E. E. Abola. 1996. Errors in protein structures. *Nature* **381**:272.
13. Koyama, Y., T. Hoshino, N. Tomizuka, and K. Furukawa. 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* **166**:338–340.
14. Koyama, Y., S. Okamoto, and K. Furukawa. 1990. Cloning of α- and β-galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus* strain T2, and their expression in *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2251–2254.
15. Laptenko, O., S. S. Kim, J. Lee, M. Starodubtseva, F. Cava, J. Berenguer, X. P. Kong, and S. Borukhov. 2006. pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *EMBO J.* **25**:2131–2141.
16. Lasa, I., J. R. Caston, L. A. Fernandez-Herrero, M. A. de Pedro, and

- J. Berenguer. 1992. Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus* HB8. *Mol. Microbiol.* **6**:1555–1564.
17. Lasa, I., M. de Grado, M. A. de Pedro, and J. Berenguer. 1992. Development of *Thermus-Escherichia* shuttle vectors and their use for expression of the *Clostridium thermocellum celA* gene in *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **174**:6424–6431.
18. Malawski, G. A., R. C. Hillig, F. Monteclaro, U. Eberspaecher, A. A. Schmitz, K. Crusius, M. Huber, U. Egner, P. Donner, and B. Muller-Tiemann. 2006. Identifying protein construct variants with increased crystallization propensity—a case study. *Protein Sci.* **15**:2718–2728.
19. Mather, M. W., and J. A. Fee. 1992. Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* HB8: expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:421–425.
20. Mendieta, J., and F. Gago. 2004. In silico activation of Src tyrosine kinase reveals the molecular basis for intramolecular autophosphorylation. *J. Mol. Graph. Model.* **23**:189–198.
21. Moreno, R. 2004. Clonaje de enzimas termoestables de interés biotecnológico y desarrollo de herramientas para su expresión en *Thermus thermophilus*. Ph.D. dissertation. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
22. Moreno, R., O. Zafra, F. Cava, and J. Berenguer. 2003. Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plasmid* **49**:2–8.
23. Ogle, J. M., F. V. Murphy, M. J. Tarry, and V. Ramakrishnan. 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**:721–732.
24. Peitsch, M. C. 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:274–279.
25. Ramirez-Arcos, S., L. A. Fernandez-Herrero, and J. Berenguer. 1998. A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**:215–227.
26. Ramirez-Arcos, S., L. A. Fernandez-Herrero, I. Marin, and J. Berenguer. 1998. Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J. Bacteriol.* **180**:3137–3143.
27. Ramirez-Arcos, S., R. Moreno, O. Zafra, P. Castan, C. Valles, and J. Berenguer. 2000. Two nitrate/nitrite transporters are encoded within the mobilizable plasmid for nitrate respiration of *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* **182**:2179–2183.
28. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
29. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**:3381–3385.
30. Selmer, M., C. M. Dunham, F. V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, and V. Ramakrishnan. 2006. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**:1935–1942.
31. Snell, F. D., and C. T. Snell. 1949. *Colorimetric methods of analysis*, 3rd ed. Van Nostrand, New York, NY.
32. Tamakoshi, M., T. Yaoi, T. Oshima, and A. Yamagishi. 1999. An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:431–437.
33. Timms, A. R., and B. A. Bridges. 1993. Double, independent mutational events in the *rpsL* gene of *Escherichia coli*: an example of hypermutability? *Mol. Microbiol.* **9**:335–342.
34. Vassilyev, D. G., S. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassilyeva, S. Borukhov, and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**:712–719.
35. Vieille, C., and G. J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:1–43.
36. Vriend, G. 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**:52–56, 29.
37. Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**:327–339.
38. Zafra, O. 2004. Implicación de un citocromo c en la biosíntesis de la nitrato reductasa respiratoria de *Thermus thermophilus*. Ph.D. dissertation. Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
39. Zafra, O., F. Cava, F. Blasco, A. Magalon, and J. Berenguer. 2005. Membrane-associated maturation of the heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **187**:3990–3996.
40. Zafra, O., S. Ramirez, P. Castan, R. Moreno, F. Cava, C. Valles, E. Caro, and J. Berenguer. 2002. A cytochrome c encoded by the *nar* operon is required for the synthesis of active respiratory nitrate reductase in *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **523**:99–102.

Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE

Felipe Cava,¹ Oleg Laptenko,^{2†} Sergei Borukhov,²
Zahra Chahlafla,¹ Emilio Blas-Galindo,¹
Paulino Gómez-Puertas¹ and José Berenguer^{1*}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,
Departamento de Biología Molecular, Universidad
Autónoma de Madrid, Madrid, 28049, Spain.

²Department of Cell Biology, UMDNJ-SOM, Stratford, NJ
08084-1489, USA.

Summary

The strains of *Thermus thermophilus* that contain the nitrate respiration conjugative element (NCE) replace their aerobic respiratory chain by an anaerobic counterpart made of the Nrc-NADH dehydrogenase and the Nar-nitrate reductase in response to nitrate and oxygen depletion. This replacement depends on DnrS and DnrT, two homologues to sensory transcription factors encoded in a bicistronic operon by the NCE. DnrS is an oxygen-sensitive protein required *in vivo* to activate transcription on its own *dnr* promoter and on that of the *nar* operon, but not required for the expression of the *nrc* operon. In contrast, DnrT is required for the transcription of these three operons and also for the repression of *nqo*, the operon that encodes the major respiratory NADH dehydrogenase expressed during aerobic growth. Thermophilic *in vitro* assays revealed that low DnrT concentrations allows the recruitment of the *T. thermophilus* RNA polymerase σ^A holoenzyme to the *nrc* promoter and its transcription, whereas higher DnrT concentrations are required to repress transcription on the *nqo* promoter. In conclusion, our data show a complex auto-inducible mechanism by which DnrT functions as the transcriptional switch that allows the NCE to take the control of the respiratory metabolism of its host during adaptation to anaerobic growth.

Introduction

In many prokaryotes, nitrogen oxides substitute for oxygen during denitrification, a series of four consecutive steps (NO_3^- : NO_2^- : NO : N_2O : N_2) catalysed by the respective reductases (Zumft, 1997; Richardson *et al.*, 2001). For a few of them, a hierarchical regulatory mechanism has been shown that co-ordinates the expression of each of these reductases in response to two specific environmental signals: (i) oxygen depletion and (ii) presence of the appropriate nitrogen oxide. In most denitrifiers, oxygen depletion is detected through a [4Fe–4S] iron–sulphur redox centre located at the N-terminal domain of a CRP (cAMP receptor protein)-like transcription factor, similar to the *Escherichia coli* FNR (fumarate and nitrate reductase regulatory protein) (Korner *et al.*, 2003). In the presence of oxygen, the iron–sulphur centre is oxidized, causing the factor to monomerize and become inactive (Crack *et al.*, 2004). In the absence of oxygen, the reduction of the [4Fe–4S] centre leads to protein dimerization through a central α -helix, allowing the protein to bind to a palindromic sequence known as anaerobox through its C-terminal helix–turn–helix (HTH) motif (Korner *et al.*, 2003). Also, there are examples of FNR and other CRP-like factors acting as transcriptional repressors at specific promoters (Busby and Ebright, 1999; Korner *et al.*, 2003).

Additionally, the presence of an appropriate nitrogen oxide must be detected by specific sensory proteins. Nitrate is usually detected by a membrane sensor (NarX) that phosphorylates a response regulator (NarL), which then binds to specific sequences upstream from the transcription start site of the corresponding nitrate reductase operons (Stewart, 1993; 2003). However, in organisms like *Paracoccus pantotrophus*, which lacks NarL homologues, a member of the CRP family of regulators named NarR detects nitrate through a yet unknown mechanism (Wood *et al.*, 2001). Interestingly, the other main signal in denitrification, nitric oxide (NO), is also detected through a subgroup of the CRP family known as Dnr (Vollack *et al.*, 1999; Korner *et al.*, 2003).

The genus *Thermus* sp. belongs to one of the oldest lineages of the bacterial phylogenetic tree (Hartmann *et al.*, 1989), and most of its isolates show an overall aerobic nature. The extreme thermophilic *Thermus*

Accepted 20 February, 2007. *For correspondence. E-mail jberenguer@cbm.uam.es; Tel. (+34) 91 497 80 99; Fax (+34) 91 497 80 87. †Present address: Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, NY 10027, USA.

thermophilus shows the same overall aerobic nature of the genus, but there are isolates of this species that carry out the first step of the denitrification pathway, growing anaerobically with nitrate and excreting nitrite as the end-product (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a), and even others that fulfil a complete denitrification, reducing nitrite to N_2 as final product (Rainey and da Costa, 2001). This ability is encoded within a > 30 kb DNA fragment that can be transferred by conjugation to aerobic strains of the same species through an Hfr-like mechanism, allowing the new hosts to grow as facultative anaerobes (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b). This nitrate respiration conjugative element (NCE) encodes two main operons, named *nar* and *nrc*. The *nar* operon codes for a thermophilic membrane nitrate reductase (Nar), which contains a periplasmic cytochrome *c* as a fourth subunit in addition to homologues to the NarG, NarH and NarI enzyme subunits found in other bacteria (Zafra *et al.*, 2005). The *nrc* operon codes for a new class of respiratory NADH dehydrogenase (NDH) made of four subunits, in contrast to the 14- to 16-meric multimer that constitutes the type I NDH, or to the monomeric type II NDH found in most bacteria (Cava *et al.*, 2004). Phylogenetic comparisons of the amino acid sequences of Nar and Nrc subunits are in agreement with the 16S RNA-based phylogeny of the genus, and also suggest an ancient origin for both enzymes (Philippot, 2002; Cava *et al.*, 2004). When a NCE-carrying *T. thermophilus* strain grows in a nitrate-rich medium under laboratory conditions, depletion of oxygen either due to consumption by the increasing population or experimentally induced leads to the apparently simultaneous induction of the *nar* and *nrc* operons (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a; Cava *et al.*, 2004). Interestingly, transcription of the *nqo* operon, which encodes the aerobic type I NDH of the host, is concomitantly repressed (Cava *et al.*, 2004). Therefore, the *T. thermophilus* strains carrying NCE replace not just the final electron acceptor enzyme, but the whole respiratory chain, during transition to anaerobic growth with nitrate. In contrast, menaquinone-8 is common to both respiratory processes (Cava *et al.*, 2004).

In a previous work we observed that the nitrate- and anoxia-dependent transcription of the *nar* operon promoter required the presence of the NCE (Moreno *et al.*, 2003), and therefore we concluded that the regulatory factors required for the respiratory chain replacement in response to these signals were encoded within this transferable element. Here we identify a bicistronic operon (*dnr*) in the NCE that encodes DnrS and DnrT (RegA and RegB in Cava and Berenguer, 2006), two homologues to bacterial transcription and sensory factors. The development of new promoter-probe and expression vectors allow us to show here that both proteins are required for the expression of the operons of the NCE when the cells

grow in a medium with nitrate under low oxygen concentrations. We find that DnrS is an oxygen-sensitive protein required for the expression of the *nar* and *dnr* operons under anaerobic conditions, whereas DnrT is the central regulatory factor required not only to activate the transcription from all the NCE operons but also to repress the transcription from the *nqo* operon. To our knowledge, this is the first time in which a single thermophilic transcription factor is shown to activate and to repress *in vitro* transcription by the RNA polymerase of *T. thermophilus* on two different promoters. Its dual role as transcription activator of the NCE operons and as repressor of the chromosomally encoded *Nqo* points to DnrT as the central switching mechanism by which the NCE controls the respiratory metabolism of its host during adaptation to anaerobic growth.

Results

NCE encodes two homologues of bacterial transcription factors

Sequence analysis of the NCE revealed the presence of two genes, preliminarily named *regA* and *regB* (Cava and Berenguer, 2006), encoded in the DNA region that separates the *nar* and the *nrc* operons (EMBL Accession No. AM161043) (Fig. 1A). The proximity of the coding sequences of both genes (4 bp) and the presence of a Rho-independent transcription terminator downstream of the translation stop codon of *regB* suggested that they form a bicistronic operon. This was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays on RNA isolated from cells incubated for 4 h under anoxic conditions with nitrate (*Experimental procedures*), in which the expected 1440 bp amplification fragment was obtained with forward primer 1, specific for *regA*, and reverse primer 3, specific for *regB* (Fig. 1B). In contrast, the use of reverse primer 4, which hybridizes downstream the putative transcription terminator, was unsuccessful.

The amino acid sequence motifs and main similarities to proteins from the databank of the hypothetical proteins encoded by *regA* and *regB* are also shown in Fig. 1. The *regA* gene encodes a 467-amino-acid-long protein, with a theoretical size of 52.6 kDa. A search for sequence motifs at the NCBI server revealed the presence of an N-terminal (positions 1–120) GAF (cGMP-specific and -stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* adenylate cyclases and *E. coli* FhlA) domain usually involved in signal detection in several proteins (Aravind and Ponting, 1997; Galperin, 2004). There is an additional BTAD domain (bacterial transcriptional activator domain) shared by all the members of the DNRI/REDD/AFSR family of transcription regulators involved in secondary metabolism in *Streptomyces* sp. and related Actinobacteria (Yeats *et al.*,

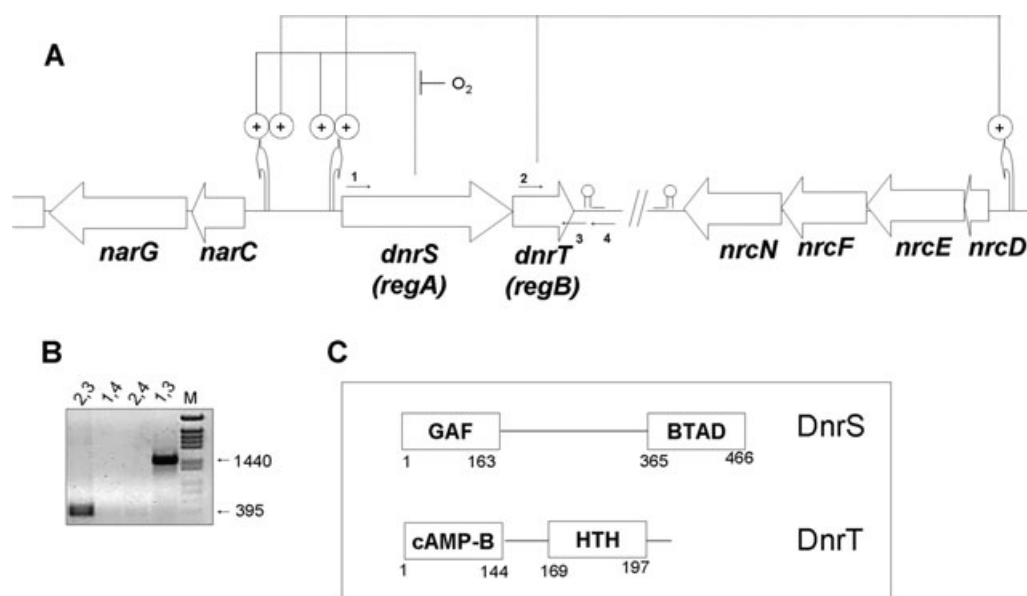


Fig. 1. The *dnr* operon.

A. Scheme of the *dnr* operon, and the relative position of the *nrc* and part of the *nar* operons that surrounds it. Dotted lines on the top indicate the roles of DnrS and DnrT as transcription activators of the indicated NCE promoters shown in this article.

B. RT-PCR assay with the indicated primers pairs on total RNA isolated from cells grown for 4 h under nitrate/anoxia conditions. Primers used were regANde1 (1), o27-77 (2), dnrTstop (3) and o27-81 (4), and their approximate annealing positions are indicated in (A).

C. Scheme of the positions of the domains identified in DnrS and DnrT.

Details are described in the text.

2003). This domain structure suggests a putative role as a signal-sensitive transcription factor for the hypothetical RegA protein. This protein will be named DnrS thereafter to avoid confusion with proteins from other microorganisms.

On the other hand, *regB* encodes a 217-amino-acid-long protein with a theoretical size of 24.8 kDa. Its coding sequence starts with a GTG codon. Sequence comparisons revealed that RegB belongs to the CRP family of transcription activators, sharing the C-terminal HTH DNA-binding motif common to all the family members, and also showing an N-terminal nucleotide-binding motif, like the CRP protein. More precisely, the sequence alignment with members of this family (Fig. S1) revealed the highest percentages of identity with members of the Dnr subgroup of this CRP family, most of which are implicated in signal transduction of NO (DnrE, DnrD) or nitrate (NarR) presence in denitrifying Proteobacteria (Korner *et al.*, 2003). Due to these similarities and to the role in nitrate respiration that we describe in this article, we renamed *regB* as *dnrT*. As all its closest homologues, DnrT lacks the four cysteine residues that in members of the CRP family, like the FNR protein, are responsible for the detection of oxygen through a 4Fe–4S cluster. Interestingly, the sequence of the HTH motif of DnrT keeps the highly conserved residues E182, S185 and R186, which interact directly with the DNA sequence target in most proteins of the CRP family (Korner *et al.*, 2003) (Fig. S1).

DnrS and DnrT are induced in T. thermophilus during anaerobic respiration

To be sure that hypothetical DnrS and DnrT proteins were actually synthesized in *T. thermophilus*, their respective coding genes were cloned, overexpressed in *E. coli*, and specific polyclonal rabbit antisera were prepared for each of them (*Experimental procedures*). These antisera showed similar sensitivities for their respective proteins in parallel Western blot assays (Fig. S2A), thus making it possible to compare DnrS and DnrT amounts by their respective signals.

As shown in Fig. 2A, specific signals for proteins of the sizes expected for DnrS and DnrT were immunodetected in the soluble fraction of the facultative wild-type strain NAR1 (lane 3) treated for 4 h under anoxic conditions with nitrate (An conditions). Parallel immunodetection of NarG (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a) and NrcD (Cava *et al.*, 2004) were carried out on the corresponding membrane fractions to confirm the expression of the Nar and Nrc respiratory enzymes under these conditions. As expected, none of these proteins (DnrT, DnrS, NrcD and NarG) were detected in the aerobic strain *T. thermophilus* HB27 (lane 1) subjected to the same treatment, but they did in its HB27c derivative (lane 2) that carries the NCE element (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b). Interestingly, when the facultative wild-type strain was grown aerobically (A), a low amount of DnrT was detected by Western blot (lane 3),

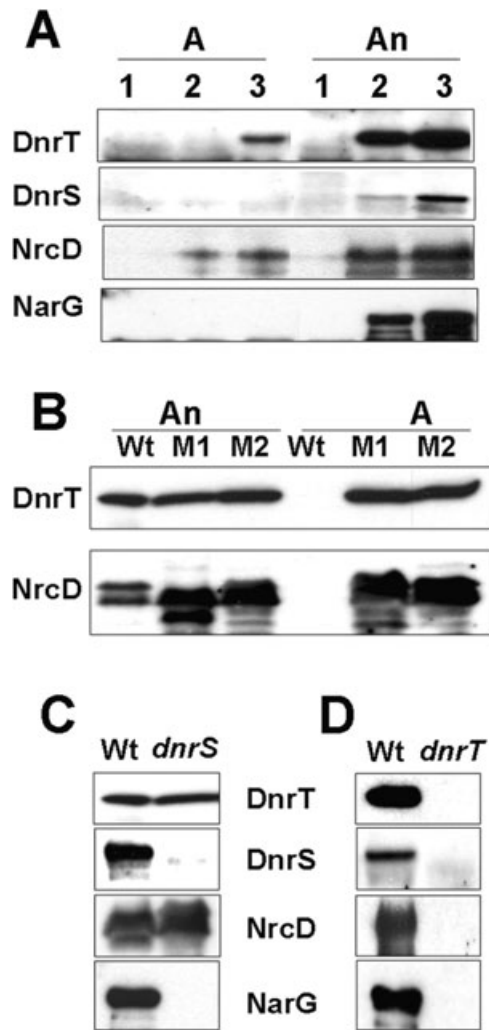


Fig. 2. Requirement of the *dnr* operon genes for the expression of the Nar and Nrc respiratory complexes.

A. Total proteins from the *T. thermophilus* strains HB27 (1), HB27c (2) and NAR1 (3), grown either aerobically (A) or after 4 h under nitrate/anoxia conditions (An), were subjected to parallel Western blots to detect DnrT, DnrS, NrcD and NarG.

B. Western blots showing DnrT and NrcD were carried out on cultures of the NAR1 wild-type strain (Wt) and in two independent *dnrS::kat* null mutants (M1 and M2) grown either aerobically (A) or treated for 4 h under nitrate/anoxia-inducing conditions (An). Note the constitutive expression of DnrT and NrcD under aerobic conditions in the mutants.

C. Western blots to detect DnrT, DnrS, NrcD and NarG on nitrate/anoxia induced cultures of the wild-type NAR1 strain (Wt) or of a *dnrS::kat* null mutant (*dnrS*).

D. Western blots to detect DnrT, DnrS, NrcD and NarG were carried out as in (C) on the wild-type strain and on the *dnrT* null mutant.

and longer exposure times allowed its detection also in the HB27c strain. Detection of NrcD followed the same pattern. In contrast, detection of DnrS under aerobic conditions was not evident unless larger protein amounts and longer exposure times were used. The final conclusion from these experiments was that DnrT and DnrS are not

hypothetical but actual proteins, which are expressed in *T. thermophilus* at low levels during aerobic growth but induced during anaerobic growth with nitrate. Having in mind that the respective antisera show similar sensitivities for immunodetection of both proteins by Western blot (Fig. S2A), and that the two proteins are translated from a single mRNA (Fig. 1B), these data suggest for DnrS either lower translation efficiency or a less stable character than for its co-expressed DnrT counterpart.

DnrS and DnrT are required for anaerobic growth

Null mutants of *dnrT* and *dnrS* were isolated (*Experimental procedures*). Due to their operon nature and to the absence of a transcription terminator at the end of the *kat* gene, the DnrT protein was constitutively expressed in two independent *dnrS::kat* mutants (Fig. 2B, lanes M1 and M2), in such a way that similar levels of DnrT were detected in cultures grown aerobically (A) as in those treated for 4 h with nitrate under anoxic conditions (An). By comparison, the DnrT protein was expressed by the wild-type strain under aerobic conditions at such a low level that it was not detected under the exposure time shown in this figure. On the other hand, no polar effect of the *dnrT* null mutation on the expression of the DnrS protein was expected. In fact, expression of DnrS required the presence of DnrT (see below).

Parallel growth experiments revealed that neither the *dnrS* nor the *dnrT* null mutant was able to grow under complete anaerobic conditions with nitrate (not shown). As all the *nrc::kat* null mutants are still able to grow anaerobically with nitrate (Cava *et al.*, 2004), the inability of the *dnrS* and the *dnrT* null mutants to grow under such conditions suggests that the expression of DnrT and DnrS is required for the synthesis of the nitrate reductase, the only component of the respiratory machinery which is fully required for anaerobic growth (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a). This was confirmed by the results of Fig. 2C and D, which show that NarG was not expressed in any of the mutants under inducing conditions. However, there was a clear difference between both mutants with respect to the expression of NrcD: whereas the *dnrT* null mutant was unable to express it (Fig. 2D), in the *dnrS::kat* mutant the NrcD protein was expressed anaerobically (Fig. 2C) and even during the aerobic growth (Fig. 2B). It is then noteworthy that the expression of NrcD is concomitant to that of DnrT, which is expressed constitutively in *dnrS::kat* mutants. A final conclusion from these assays was that the DnrS protein was not expressed in the *dnrT* null mutant, supporting that DnrT is also required for the expression of its own operon (Fig. 2D).

To confirm these results, complementation experiments of each mutant were carried out. For this we used pWUR112/77-1 (pWUR thereafter) derivatives, which

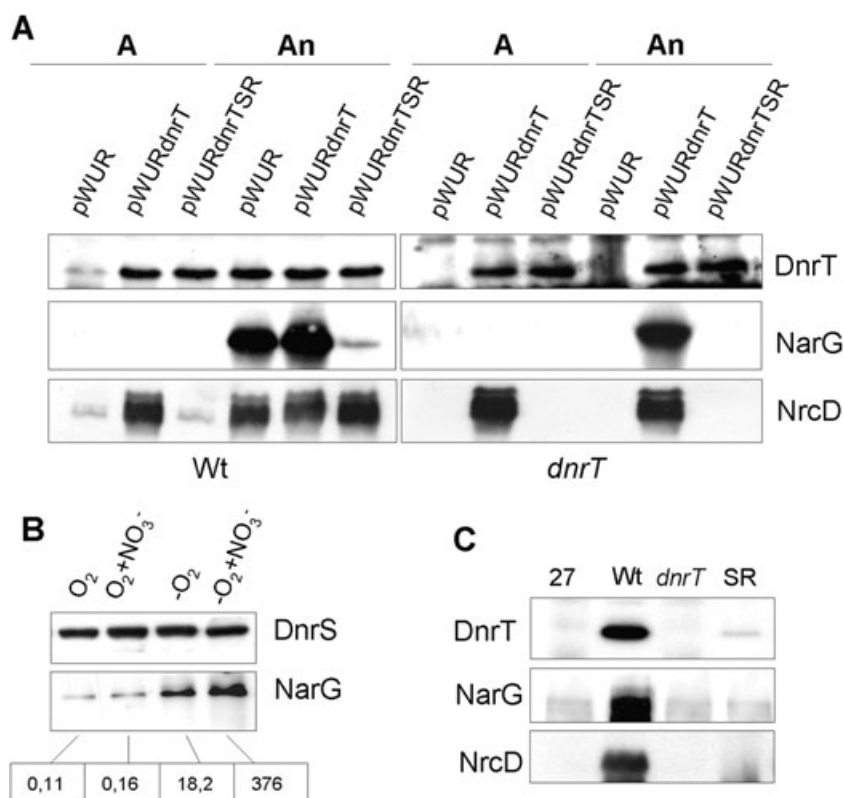


Fig. 3. Constitutive expression of DnrS and DnrT, and the role of the HTH motif of DnrT. **A.** Western blots to detect DnrT, NarG and NrcD were carried out on aerobic (A) or on nitrate/anoxia-induced (An) cultures of the NAR1 (Wt) and the *dnrT* null strains (*dnrT*) transformed, either with the pWUR control plasmid, or with its derivatives that express the wild-type DnrT (pWURdnrT) protein or its SR/AL mutant (pWURdnrTSR).

B. Cultures of the *dnrS::kat* null mutant transformed with plasmid pWURdnrS were grown aerobically, or incubated overnight under anoxic conditions in the presence or in the absence of nitrate (40 mM) before immunodetection of DnrS and NarG. The nitrate reductase activity of the cultures was also measured (nmol of nitrite produced per minute and per milligram of protein).

C. Detection of the indicated proteins on nitrate/anoxia-treated cultures of the aerobic HB27 strain (27), the facultative NAR1 strain (Wt), the *dnrT* null mutant, and a mutant in which the *dnrT* gene was replaced by that encoding the SR/AL DnrT mutant (SR).

confer a thermostable resistance to Bleomycin (Brouns *et al.*, 2005) that is compatible with the resistance to Kanamycin of the *dnrS* and *dnrT* null mutants (this work). As shown in Fig. 3A, transformation of the wild-type strain or the *dnrT* null mutant with pWURdnrT results in constitutive expression of DnrT during aerobic growth (A). Concomitant to the constitutive synthesis of DnrT, the NrcD protein is strongly expressed. In contrast, constitutive expression of DnrT does not guarantee the expression of NarG in the wild type or in the *dnrT* null mutant during aerobic growth, and its synthesis was still dependent on oxygen depletion and nitrate presence (An).

On the other hand, constitutive expression of DnrS from pWURdnrS in a *dnrS::kat* genetic background, in which DnrT is also constitutively expressed (Fig. S2B), does not result in the expression of significant amounts of NarG under aerobic conditions (Fig. 3B, lane O₂). However, it is interesting to note the existence of a partial expression of NarG under anoxic conditions in the absence of nitrate when both, the DnrT and the DnrS proteins, are constitutively expressed (Fig. 3B, lane -O₂). Nevertheless, full expression of NarG still requires nitrate in addition to anoxia.

These results allowed us to conclude that: (i) DnrT is required for the synthesis of NarG, NrcD and DnrS, (ii) the DnrT-dependent activation of the NrcD synthesis is insensitive to oxygen and does not require nitrate, (iii) DnrS is

required for the expression of NarG but not for that of NrcD, and (iv) expression of NarG is still dependent on nitrate and anoxia, although DnrT and DnrS were present.

The HTH motif of DnrT is required to activate the expression of the three NCE operons

In order to analyse *in vivo* if this activator role of DnrT on the synthesis of the NarG, NrcD and DnrS was related to its hypothetical ability to bind to the respective gene promoters, the complementation experiment of the *dnrT* null mutant was repeated with a DnrT site-directed mutant in which two highly conserved residues of its putative HTH motif (S185 and R186) were changed by A and L respectively (SR/AL mutant thereafter). Figure 3A shows how the constitutive expression of this SR/AL DnrT protein from plasmid pWURdnrTSR does not allow the synthesis of NarG or NrcD in a *dnrT* null mutant background. As the amount of the SR/AL mutant protein detected by Western blot in cells transformed with pWURdnrTSR was similar to the amount of wild-type DnrT observed in cells transformed with pWURdnrT, the differences in their effects on the expression of NarG and NrcD were necessarily the consequence of a mutation-associated function loss, and not due to putative differences in their stability. Thus, the DnrT-dependent synthesis of NarG and NrcD is most likely a consequence of the transcription activation of the

respective gene promoters after the binding of DnrT through its HTH motif. It is also noteworthy that the expression of the SR/AL mutant from pWURdnrTSR interferes with the synthesis of NarG under nitrate and anoxia in the wild-type strain (Fig. 3A).

The experiments above supported the hypothesis that the activating effect of DnrT on Pnar and Pnrc was dependent on its HTH motif, but did not inform us about the putative role of DnrT on its own expression. To analyse this, the chromosomal wild-type *dnrT* gene was replaced by the mutant one encoding the SR/AL DnrT protein (*Experimental procedures*). The results of Fig. 3C show that neither the DnrT SR/AL mutant protein nor the NarG or the NrcD protein was induced under conditions in which the three proteins were expressed in the wild-type strain. Consequently, DnrT most likely acts as a transcription activator by binding through its HTH motif to the promoters of the *nar*, *nrc* and *dnr* operons.

Effects of DnrS and DnrT on the activity of the Pnar, Pnrc and Pdnr promoters

To analyse and to quantify the putative effect of DnrS and DnrT on the transcription of the *nar*, *nrc* and *dnr* operons, the promoter region of each of them was cloned upstream of a reporter gene (*bgaA*) encoding a thermostable beta-galactosidase (*Experimental procedures*). The constructs were then inserted into pMH184, a new cloning vector that confers a thermostable resistance to Hygromycin B (Nakamura *et al.*, 2005; this work), which is compatible with the thermostable resistances to Kanamycin and Bleomycin. In this way, it was possible to quantify the beta-galactosidase activity expressed from each promoter even in Kanamycin-resistant mutants (*dnrT* and *dnrS*) transformed with plasmids conferring Bleomycin resistance (pWUR-derivatives). The beta-galactosidase activities were measured under four different conditions: presence or absence of oxygen, and presence or absence of nitrate. The results are shown in the Fig. 4.

As expected, none of these promoters were expressed under any condition in the aerobic strain *T. thermophilus* HB27, which lacks the NCE (< 20 units). In contrast, in the wild-type facultative strain (NAR1), the Pnar and the Pnrc promoters were strongly induced under anoxic conditions with nitrate ($5\text{--}6 \times 10^3$ units), whereas the Pdnr promoter was induced at a much weaker level ($6\text{--}7 \times 10^2$ units), as it could be expected for genes encoding regulatory proteins. These data represents for Pnar, Pnrc and Pdnr, a 56-fold, 97-fold and 14-fold induction of their respective basal levels (40–100 units) under aerobic growth without nitrate. Neither nitrate nor anoxia was able to induce the Pnar or Pnrc promoters independently in a significant way (less than 2-fold), although a slight expression of Pdnr (3- to 4-fold) was observed with nitrate alone (Fig. 4C). The

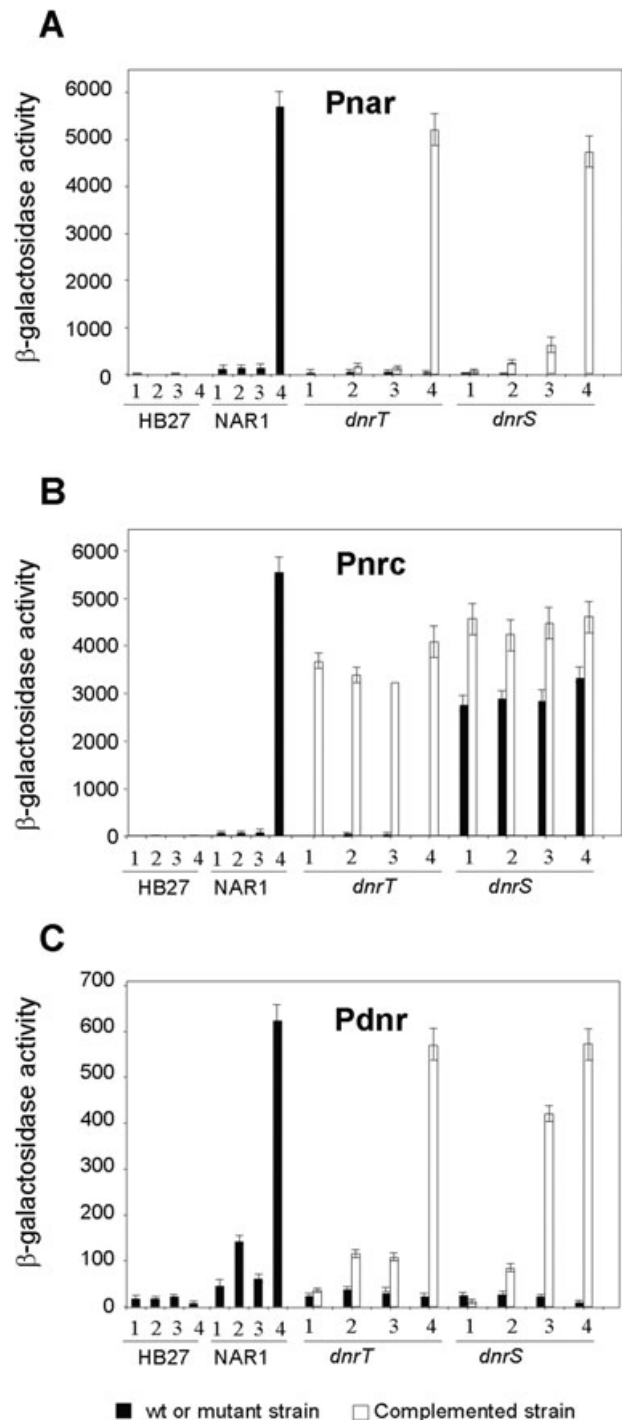


Fig. 4. Quantification of the transcriptional activity of the *nar*, *nrc* and *dnr* operon promoters. The indicated strains carrying the promoter-probe plasmids pMHnarbgaA (A), pMHnrcbgaA (B) or pMHdnrbgaA (C) were transformed either with pWUR (black bars) or with a pWUR derivative that complemented the strains by expressing the corresponding DnrS or DnrT proteins constitutively (white bars). Then the beta-galactosidase activity of cultures grown aerobically without (1), or with nitrate (2), or anaerobically without (3) or with nitrate (4) was measured (*Experimental procedures*). The represented data correspond to the mean values of three independent experiments.

results also showed that none of these promoters was expressed in a *dnrT* null mutant, reinforcing the view of DnrT as a central transcription activator during nitrate respiration. We also observed that constitutive expression of DnrT (from pWURdnrT) induced transcription from Pnrc (60- to 70-fold), independently of the presence or absence of oxygen and/or nitrate (Fig. 4B). In contrast, constitutive expression of DnrT did not affect the nitrate and anoxia dependence of Pdnr and Pnar. These results support that the activator effect of DnrT on the Pnrc promoter is signal-insensitive, and that DnrT and one or more additional signal-sensitive transcription factors are required to activate the transcription from the Pnar and Pdnr promoters.

On the other hand, the absence of DnrS in the *dnrS::kat* mutant abolished transcription from Pnar and Pdnr (Fig. 4A and C). In contrast, Pnrc was constitutively expressed (47- to 70-fold) in the *dnrS::kat* mutant, as expected from the polar effect of the mutation on *dnrT* (Fig. 2B). Interestingly, simultaneous expression of DnrS from the complementation pWURdnrS plasmid and of DnrT (because of the polar effect of the *dnrS::kat* mutation, Fig. S2B) does not make the transcription from Pnar and Pdnr signal-independent. In such conditions, anoxia by itself has a minor (sixfold) stimulating effect on Pnar expression, but combination with nitrate is still required to get a strong induction (47-fold). This is in agreement with the data from Fig. 3B showing a minor induction of the NarG protein and of the nitrate reductase activity under anoxic conditions. In contrast, Pdnr was significantly induced by anoxia alone (10-fold, a 70% of the maximum detected in the wild-type strain), whereas nitrate had only a minor effect on its expression (Fig. 4C) in these complemented *dnrS::kat* mutants. Thus, we deduced that DnrS functions as an oxygen-sensitive transcription factor that works in cooperation with DnrT for the activation of Pnar and Pdnr. However, a yet unknown nitrate-sensitive component of the induction apparatus is apparently also required, in special to stimulate transcription from the Pnar promoter.

DnrS changes its folding in the presence of oxygen

The data above supported that DnrS requires anaerobic conditions to allow transcription from the Pdnr promoter. Thus, we wondered if oxygen-induced inactivation of DnrS could affect its folding. To check this, the DnrS protein was expressed from vector pWURdnrS in two cultures of *T. thermophilus* grown under aerobic conditions or under anoxic conditions with nitrate, before its sensitivity to trypsin was compared and detected by Western blot (*Experimental procedures*). As shown in Fig. 5, the DnrS protein expressed under anaerobic conditions remained undigested by the protease after 1 min of treatment, whereas most of the DnrS protein

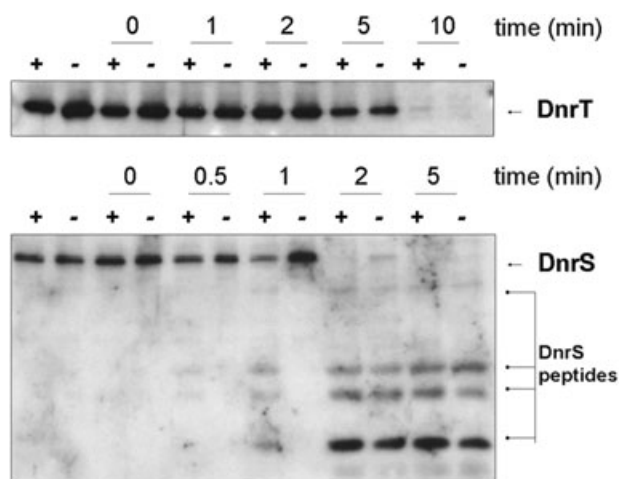


Fig. 5. Sensitivity of DnrT and DnrS to oxygen. The cytoplasmic fraction of aerobic (+) and anaerobic (–) cultures of the wild-type mutant transformed with pWURdnrT or with pWURdnrS was treated during the indicated periods with trypsin (*Experimental procedures*), and the remaining protein and resulting peptides were immunodetected by Western blot with the respective antisera.

from the aerobic culture was digested in the same period. In contrast, the DnrT protein expressed from pWURdnrT showed a lower sensitivity to the protease irrespective of the conditions used to express the protein. It is interesting to note that DnrS degradation products were similar in the protein expressed under both conditions, suggesting that similar oxygen-mediated folding change is taking place during the protease treatment.

Purified DnrT activates transcription on Pnrc

The results from the Fig. 4 showed the relevance of DnrT as a common transcription activator required for the expression of the *nar*, *nrc* and *dnr* operons, and revealed its post-translational signal-insensitive character, at least when acting on the Pnrc promoter. Taking advantage of this apparently insensitive nature, we expressed in *E. coli* and purified the DnrT wild-type protein and its SR/AL mutant (*Experimental procedures*). During this purification, size-exclusion chromatography revealed a retention time for DnrT corresponding to 45–50 kDa, around twice its theoretical size, suggesting that DnrT forms a dimer (data not shown).

Subsequent *in vitro* experiments with the purified protein showed the ability of the wild-type DnrT protein to bind to the Pnrc promoter. In particular, DNase I footprint assays at 50°C revealed that DnrT was able to protect a large sequence (CCTTCACCTTACTCCTTGACCCCG-GTCAT) creating a hypersensitivity site at position –43 (underlined) with respect to the transcription start point of the Pnrc promoter (Fig. S3). Further recruitment experi-

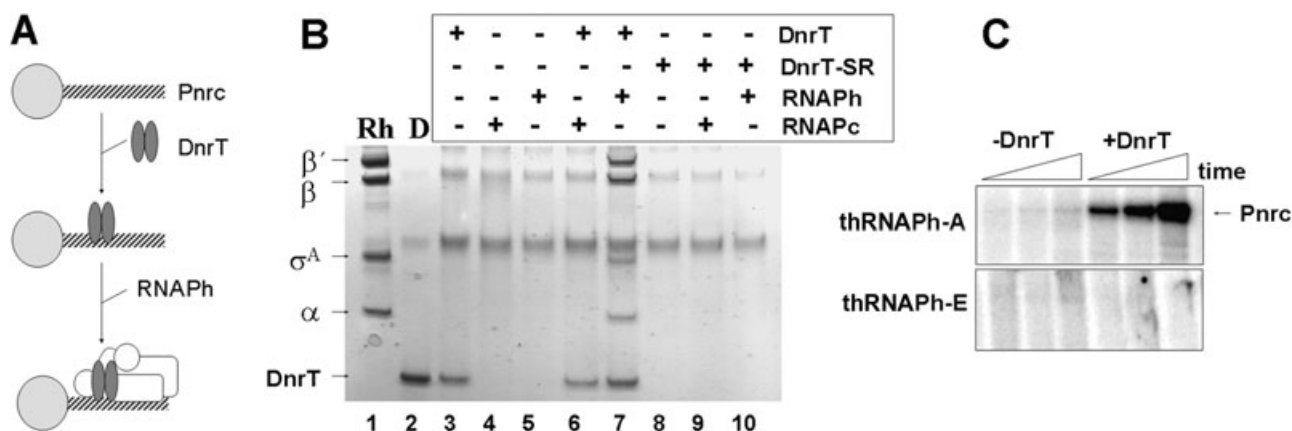


Fig. 6. Activation of Pnrc by DnrT.

A. Scheme of the recruitment experiment. The Pnrc promoter (grey-black helix) bound to streptavidin-agarose beads (grey ball) was incubated with DnrT or its SR/AL mutant, and subjected to a further incubation with thRNAP core or holoenzyme. Proteins bound to the beads were recovered by centrifugation and analysed by PAGE.

B. Results of the recruitment experiment. Samples of the immobilized Pnrc were incubated in the presence (+) or absence (-) of DnrT (DnrT), its SR/AL mutant (DnrT-SR), the thRNAPh (RNAPh) or the thRNAPc (RNAPc), and proteins bound to the beads were analysed through a 4–20% NuPAGE Bis-Tris gradient gel (lanes 3–10, see the text for details). Standards corresponding to purified thRNAPh (Rh, 1) and DnrT (D, 2) were run in parallel, and positions of each protein subunit are indicated. Common bands in all the lanes correspond to the BSA fraction present in the buffer.

C. *In vitro* transcription on Pnrc by the thRNAPh carrying either the σ^A (thRNAPh-A) or the σ^E (thRNAPh-E) in the presence or absence of 5 pmol of DnrT. Samples were taken after 2, 5 and 15 min. The full transcript corresponds to a 47-mer run-off of the Pnrc promoter.

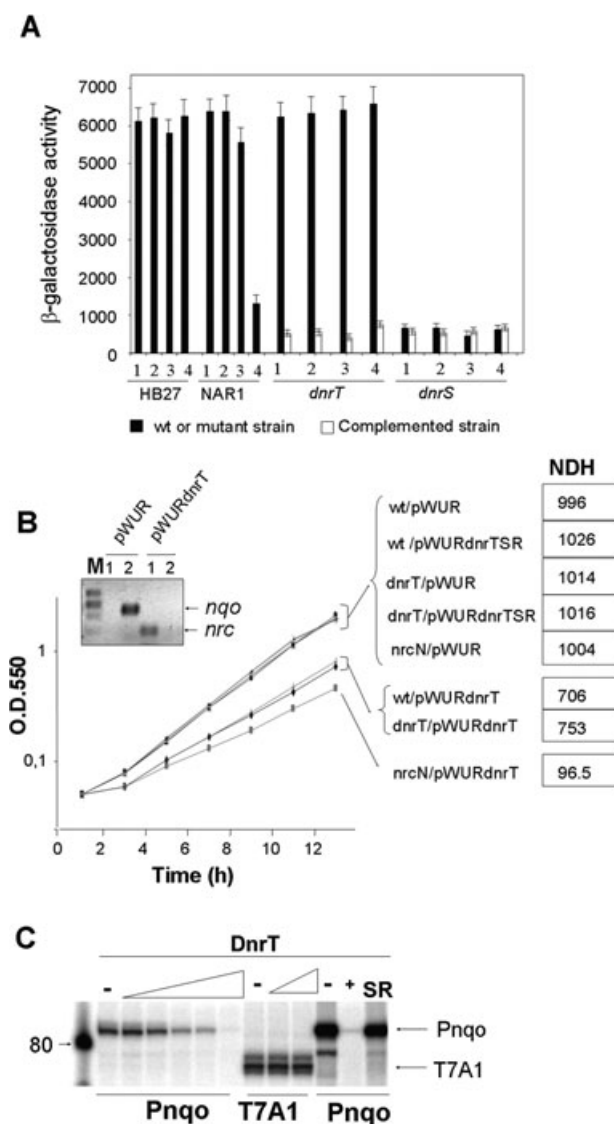
ments were carried out to determine if DnrT was required or not for the binding of the *T. thermophilus* RNA polymerase (thRNAP) to the Pnrc promoter. Figure 6A shows a scheme of the procedure followed. In this, biotin-labelled Pnrc promoter was bound to streptavidin-agarose beads and used as a bait to bind the wild-type DnrT protein or its SR/AL derivative at 50°C. Then the samples were incubated with the RNA polymerase core (thRNAPc) or its σ^A (σ^A)-bearing holoenzyme (thRNAPh), and the bound proteins were recovered by centrifugation and analysed by SDS-PAGE. The results are shown in Fig. 6B. As expected, the wild-type DnrT was recovered bound to the Pnrc promoter (lane 3), whereas its SR/AL mutant did not (lane 8). Neither thRNAPc nor thRNAPh was able to bind to the promoter by themselves (lanes 4 and 5). However, the presence of DnrT efficiently recruited thRNAPh (lane 7) but not thRNAPc (lane 6). As expected, the SR/AL mutant protein was able to recruit neither thRNAPc nor thRNAPh (lanes 9 and 10), because of its inability to bind itself to the promoter. Thus, we concluded that DnrT binds to the Pnrc promoter through its HTH domain and recruits the thRNAPh.

Further evidence of the role of DnrT on the activation of the transcription from Pnrc by the thRNAPh was obtained by *in vitro* experiments at near physiological (60°C) temperatures. As shown in Fig. 6C, thRNAPh alone exhibits only trace transcriptional activity on Pnrc, whereas in the presence of increasing concentrations of the DnrT protein, it efficiently generates a full-length transcript. Interestingly, a thRNAPh carrying the σ^E (σ^E)

factor instead of the σ^A (σ^A) was unable to initiate transcription in the presence of DnrT. Therefore, *in vitro* transcription from Pnrc requires only DnrT and its cognate σ^A -thRNAPh, is insensitive to oxygen, and does not require nitrate. In contrast, transcription experiments on the Pnar and Pdnr promoters with the DnrT and thRNAPh were unsuccessful (not shown), in agreement with our *in vivo* data showing a requirement for at least DnrS in addition to DnrT (Fig. 4). Addition of purified DnrS protein (from *E. coli*) to the *in vitro* transcription reactions was also unsuccessful.

DnrT represses *nqo*

As commented before, the *nqo* operon encodes the type I NDH that constitutes the main electron donor during aerobic growth. As *nqo* transcription is repressed during anaerobic growth with nitrate (Cava *et al.*, 2004), we decided to test whether DnrT or DnrS was implicated in such repression. As a first approach, we used promoter-probe constructs to analyse the transcription from the Pnqo promoter under the same conditions and strains used in the experiment shown in Fig. 4. As it can be deduced from Fig. 7A, the Pnqo promoter was constitutively active in the aerobic strain HB27 ($6\text{--}7 \times 10^3$ units) in every condition assayed (1–4). In contrast, in the facultative NAR1 strain, this promoter was repressed (to around one-fifth of its activity) upon incubation with nitrate and anoxia for 4 h (4). Interestingly, this repression did not occur in a *dnrT* null mutant, supporting the responsibility



of DnrT on this effect. This was confirmed by expressing DnrT in a constitutive way from pWURdnrT, which resulted in Pnqo repression (1/10 of its normal activity) even under aerobic growth. Moreover, a similar repression was also found in *dnrS::kat* mutants (they express DnrT constitutively), reinforcing the idea that DnrT but not DnrS was responsible for the observed Pnqo repression.

To test this directly, DnrT was constitutively expressed in *T. thermophilus* from pWURdnrT during aerobic growth (without nitrate) and the amount of mRNA synthesized from *nqo* and *nrc* operons was subsequently analysed by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the expression of DnrT leads to the repression of Pnqo and to the concomitant activation of Pnrc even during aerobic growth (Fig. 7B, inset). Interestingly, when the growth of the wild-type and the *dnrT* null mutant strains bearing

Fig. 7. DnrT represses Pnqo.

A. The transcriptional activity of the Pnqo promoter was measured under the four conditions used in Fig. 4 on the indicated strains carrying the pMHnqobgaA plasmid and complemented (white bars) or not (black bars) with the pWUR derivatives expressing either DnrS or DnrT.

B. Inset shows the result of a semi-quantitative RT-PCR performed to detect the transcripts from *nrc* (1) or *nqo* (2) in aerobic cultures of the NAR1 strain carrying pWUR or pWURdnrT. M: DNA size markers (759, 611, 453 and 273 bp). The graph shows the growth curves at 60°C of aerobic cultures of the NAR1 strain (wt) and of its *dnrT* and *nrcN* null mutants, transformed either with pWUR control plasmid or with pWURdnrT or pWURdnrTSR derivatives. The NDH activity of membrane fractions corresponding to 8 h of growth of each culture is indicated (nmol of NADH oxidized per minute and per milligram of protein).

C. *In vitro* transcription on Pnqo in the presence of thRNAPh and increasing concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80 pmol) of DnrT. Parallel control experiments were carried out with the T7A1 promoter and DnrT (0, 40, 80 pmol) to show the absence of repression by DnrT on this unrelated promoter. An independent experiment is also shown in which transcription from Pnqo was carried out without (–) or with 80 pmol of DnrT (+) or its DnrT-SR/AL mutant (SR). The run-off transcript from Pnqo and PT7A1 correspond to 90 mer and 50 mer respectively. All reactions were performed at 60°C for 10 min.

or not the pWUR derivatives were compared, it was observed that expression of DnrT (from pWURdnrT) decreased the growth rate in comparison with the same strain carrying the control plasmid pWUR, or expressing the DnrT SR/AL mutant (from pWURdnrTSR). We concluded that DnrT was actually decreasing the respiratory efficiency during aerobic growth due to the replacement of type I Nqo-NDH by the Nrc-NDH. Accordingly, the NDH activity from membrane fractions isolated from the cultures (time 8 h) revealed that the expression of DnrT results in a decrease in the activity of 25–30% (700–750 units) compared with those expressing the SR/AL mutant or carrying the control pWUR plasmid (around 1000 units). To identify which part of this activity was actually due to the Nrc-NDH and which was due to the Nqo-NDH remaining in the membrane, we included the *nrcN::kat* mutant in the experiment (Cava *et al.*, 2004). As shown in Fig. 7B the *nrcN::kat* mutant grows aerobically as the wild-type strain when carrying the pWUR control plasmid or when expressing the SR/AL mutant, and shows similar NDH activity (around 1000 units). In contrast, expression of DnrT in this *nrcN::kat* mutant resulted in a very low NDH activity (around 100 units) and in a further decrease of the growth rate of the strain in comparison with that shown by the wild-type strain expressing DnrT. This residual NDH activity most likely corresponds to the Nqo-NDH still remaining in the membrane, which is in agreement with the repression of the *nqo* promoter by the pWURdnrT plasmid detected in Fig. 7A. Additionally, these data show that the Nrc complex is active as NDH in the wild-type strain when expressed under aerobic conditions, but not as efficient for growth as the Nqo type I NDH is.

A final approach to ascertain the repression of *nqo* operon by DnrT was an *in vitro* transcription assay with the thRNAPh. As shown in Fig. 7C, Pnqo was transcribed by the thRNAPh, and the addition of increasing concentrations of DnrT to the reaction mix resulted in decreased transcription until complete repression. In contrast, in control experiment, transcription from unrelated T7A1 promoter was not affected, even by the highest concentration of DnrT assayed. As expected, transcription from Pnqo was not repressed by the SR/AL mutant in an independent experiment (lane SR). These results support our conclusion that the observed repression of Pnqo by DnrT was promoter-specific and dependent on its HTH motif.

Discussion

The ability of some strains of *T. thermophilus* to use nitrate as electron acceptor during anaerobic growth requires the replacement of the aerobic respiratory chain, whose main electron donor is the Nqo type I NDH, by a specific respiratory chain made of the heterotetrameric enzymes NDH (Nrc) and nitrate reductase (Nar) (Cava *et al.*, 2004). Here we identify a new operon of the NCE that encodes two transcription factors implicated in this replacement of respiratory chains. In the following paragraphs we discuss their specific roles according to our data.

The DnrS protein

The analysis of null *dnrS::kat* mutants, in which the DnrT protein is constitutively expressed, and the complementation assays with plasmid pWURdnrS revealed the requirement of the DnrS protein for the expression of Nar but not for the expression of Nrc. The development of a new system of promoter-probe vectors, compatible with other thermostable antibiotic resistances, allowed us to observe that this effect took place at the transcription level. Moreover, we could observe that DnrS was required also to activate transcription from its own promoter. Having in mind that DnrS has a C-terminal BTAD domain, found in the DNRI/REDD/AFSR family of regulators of secondary metabolism of Actinobacteria, we concluded that DnrS most likely acts as a transcription activator on the Pnar and Pdnr promoters.

However, constitutive expression of DnrS from plasmid pWURdnrS in a *dnrS::kat* mutant, in which DnrT is constitutively expressed, did not allowed transcription from Pnar or Pdnr under aerobic growth. Therefore, either the activities of DnrS or DnrT were sensitive to nitrate or to oxygen, or alternatively, an unknown factor necessary for the transcription from these promoters was not expressed or inactive under such conditions. The analysis of the separate effects of these two signals in cells expressing

DnrS and DnrT constitutively revealed that maximum activity required both signals. Nevertheless, oxygen depletion was more relevant than nitrate on the transcription of the Pnar and Pdnr promoters. This was specially relevant for the Pdnr promoter, in which oxygen depletion produced a significant transcription increase (73% of its maximum) in the absence of nitrate. Having in mind the apparently insensitive character of DnrT on the activation of Pnrc (see below), these results lead us to propose DnrS as an O₂-sensitive component of the induction system.

In agreement with its apparent O₂-sensitive character, the protein DnrS has a GAF domain at its N-terminus. Such domains are found in several cytoplasmic sensory proteins, either associated to other signalling domains such as histidin kinases, adenylate cyclases, diguanilate cyclase/phosphodiesterases and protein phosphatases, or associated to output domains (Galperin, 2004), like the BTAD domain found in DnrS. The signal receptor role of the GAF domains is usually associated to their capability to bind small molecules. In fact, there are precedents of oxygen and/or NO sensing by the GAF domains of the DosS protein of *Mycobacterium tuberculosis* (Sardiwal *et al.*, 2005) and of the NorR protein of *E. coli* (D'Autreaux *et al.*, 2005). The way by which the signal is transmitted from the GAF to the output domains is not yet understood, but it is generally assumed that it implies a conformational change, which affects the folding state and, concomitantly, the activity of the regulatory domain (Galperin, 2004). In this sense, we have detected a higher protease sensitivity of the DnrS protein exposed to oxygen during its synthesis than when expressed under oxygen depletion, supporting that an oxygen-dependent conformational change that unstabilizes the protein is actually taking place. Unfortunately, we cannot associate this conformational change to a loss of function in *in vitro* assays (DNA binding, for example) because the DnrS protein purified from *E. coli* was inactive in all the assays carried out. Thus, we hypothesize that native DnrS has an oxygen-sensitive cofactor at its GAF domain that under reducing conditions allows the protein to bind to specific sequences on the Pdnr and Pnar promoters, but that upon oxidation makes the protein inactive through a conformational change. In this way, the DnrS protein could mimic the role that the FNR factor plays as oxygen sensor during nitrate respiration in *E. coli* (Korner *et al.*, 2003). A detailed molecular analysis of the way by which DnrS is inactivated by O₂ will have to wait until active DnrS could be purified from anaerobic cultures of *T. thermophilus*.

DnrT as transcription activator

DnrT is required for the synthesis of the Nar and Nrc enzymes, and also for its own expression, so it behaves

as a central regulator of the nitrate respiratory system. It is also clear from the experiments with the promoter-probe vectors that DnrT acts at the transcription level on the corresponding operon promoters. However, the form by which these three promoters are activated by DnrT differs: while it has to act in co-ordination with DnrS to stimulate transcription from Pdnr and Pnar under nitrate respiration conditions, its sole presence allows Pnrc to be transcribed, independently of the presence or absence of nitrate or oxygen. This behaviour supports that DnrT, in contrast to DnrS, is insensitive to any of these signals, in such a way that it could be considered as a constitutively active transcription factor, whose function depends basically on the concentration reached and not on a putative conformational change. In agreement to this, we found no differences in the sensitivity to trypsin between DnrT proteins produced either aerobically or anaerobically (Fig. 5). This signal-insensitive behaviour contrasts with the modular structure of the CRP family of transcription activators to which DnrT belongs. Actually, most CRP-like factors contain sensory modules at the N-terminal half of the protein that upon binding of molecules such as cAMP (CRP), 2-oxoglutarate (NtcA), or upon detection of signalling molecules such as O₂ (FNR), CO (CooA) or NO (Dnr, Nnr) by specific protein-bound sensory cofactors, suffer a conformational change that allows the protein to interact with a target sequence on specifically induced (or repressed) promoters (Korner *et al.*, 2003). In those modules evolved to detect O₂, either iron-sulphur centres or haem groups are present (Korner *et al.*, 2003), but none of them have been detected in the purified DnrT protein. However, besides iron-sulphur centres or haem groups, we cannot rule out formally the possibility that small molecules, common enough to be expressed in *E. coli*, could bind to the 'cAMP-binding domain' present in the DnrT sequence. In fact, a model for DnrT conserves the two pockets that in the CRP structure contain the cAMP molecules (Fig. S4A).

In any case, the DnrT protein purified from overproducing strains of *E. coli* was able to bind *in vitro* to the Pnrc promoter through its HTH motif (the SR/AL mutant did not bind), and to recruit purified thRNAPh in a SigA (σ^A)-dependent way, allowing the transcription to proceed under thermophilic conditions (Fig. 6C). As neither the thRNAPc nor the thRNAPh was able to bind to Pnrc by themselves under these experimental conditions, and having in mind that DnrT binds to the Pnrc promoter at a position (-43) similar to CRP on type II promoters (Fig. S3), these results support the existence of specific DnrT-thRNAPh interactions on Pnrc similar to those observed on such promoters between activation region AR3 of CRP and the C-terminal domain of σ^{70} (Busby and Ebright, 1999; Lawson *et al.*, 2004). To check if similar interactions in the *T. thermophilus* pro-

teins were likely, and having in mind the availability of high-resolution structures of thRNAPh, we used docking programs to define a putative DnrT-thRNAPh interaction model by using the DnrT AR3 region deduced from the model, and the structure of σ^A in the thRNAPh crystal (Fig. S4B). It is noteworthy that automatic docking, without any hand-conducted refinement, resulted in a DnrT-thRNAPh complex similar to modelled open promoter complex proposed by Lawson *et al.* (2004) and by Artsimovitch *et al.* (2004) (Fig. S4C). In this automatic DnrT-thRNAPh model, the AR2 region of DnrT and its putative target in the α -thRNAP are very close to each other, supporting that interactions through them take place in the DnrT-thRNAPh complex also. On the other hand, it was possible to model a nicely complementary set of interactions between the putative AR1 region of the DnrT model and the C-terminal region of the α -thRNAP on the basis of the co-crystal between CRP and the α -ecoRNAP of structure 1LB2 (Benoff *et al.*, 2002) (Fig. S4D). Although yet a model, these data support the existence of specific DnrT-thRNAPh interactions on the Pnrc promoter similar to those produced between CRP and ecoRNAPh on type II promoters (Busby and Ebright, 1999). The specificity of such interactions deduced from our model explains the absence of transcription when the thRNAPh containing σ^E was used in the transcription experiments on Pnrc (Fig. 6C).

DnrT is also required to activate transcription on Pnar and Pdnr, but comparison of their sequence with that of the region protected by DnrT on the Pnrc promoter did not reveal clear similarities, probably as a consequence of the complexity of both promoters, which also require the presence of DnrS to be activated. In spite of having no *in vitro* evidence for the binding of DnrS to DNA, our data suggest that this is most likely the way by which it helps DnrT to activate transcription. In this sense, the promoter of the operon encoding the nitrate reductase A of *E. coli* requires the binding of three proteins to get active transcription in *in vitro* assays: promoter-proximal binding of reduced dimers of FNR; promoter-distal binding of several copies of the phosphorylated nitrate-response regulator NarL; and binding of the IHF (integration host factor) protein in an intermediate region (Schroder *et al.*, 1993). Therefore, it is not surprising to find a similar complex expression requirement for the transcription of the thermophilic Pnar counterpart. In this sense, our results suggest the existence of DnrT-DnrS interactions on the Pnar promoter, not just due to the obvious requirement for both proteins to activate transcription, but also because of the inhibitory effect that the presence of DnrT SR/AL mutant has on the expression of NarG in the wild-type strain under normally inducing conditions (Fig. 3A). The most likely explanation for this result is that the mutant and the wild-type DnrT proteins

compete for interaction with DnrS, and due to the higher concentration of the first, few DnrS proteins remain available to activate transcription. In contrast, this effect does not affect expression of NrcD because of its only dependence on DnrT.

On the other hand, transcription from P_{dnr} presents some differences with respect to the expression from P_{nar}, despite the common requirement for DnrT and DnrS. On this promoter the putative nitrate-response regulator has a less relevant role once both DnrS and DnrT have been expressed. A putative 'sequential induction' model could explain this (Fig. 1A). In this model, a yet unknown nitrate-response regulator could be required to get an increase of the basal expression level of P_{dnr} as suggested by the results from Fig. 4C. A parallel or further decrease in oxygen concentration could subsequently stabilize DnrS in an active conformation (Fig. 5), allowing the autoamplification of the regulators in an anoxic environment (Fig. 4C). In this way, P_{nrc} could be induced by DnrT to provide an appropriate electron donor for nitrate (Fig. 4B) and, putatively, also for the whole denitrification pathway, whereas expression from P_{nar} would be more dependent on the continuous presence of nitrate (Fig. 4A). Supporting this hypothesis, we have preliminary evidences showing that the Nrc-NDH also constitutes the main electron donor in complete denitrifying strains of *T. thermophilus* growing on nitrite (in preparation).

DnrT as repressor

In addition to its role as transcription activator of the *nrc*, *nar* and *dnr* operons from the NCE, a main observation of this work is that DnrT also acts as repressor of the chromosomal *nqo* operon, which encodes the aerobic type I NDH. For this repression to be detected *in vitro*, a greater concentration of DnrT was required compared with that needed to activate transcription on *nrc* (Fig. 7C), thus suggesting that the amount of Nqo decreases after enough Nrc is synthesized, allowing a progressive replacement of the respiratory chains.

This replacement of Nqo by Nrc is apparently contradictory in terms of energy supply. In fact, in mesophiles like *E. coli* the proton-extruding Nqo homologue (Nuo) is induced during anaerobic growth with nitrate as a way to compensate the loss of energy that the use of nitrate instead of oxygen implies, whereas the non-proton-pumping type II NDH is expressed in the presence of oxygen, when the cells do not require the use of a high-yield energy metabolism (Unden and Bongaerts, 1997). Interestingly, this replacement of respiratory enzymes in *E. coli* is under the control of FNR, a DnrT homologue. Although Nrc is inhibited by Rotenone as Nqo does, its subunit architecture, similar to the non-proton-pumping succinate:quinone oxidoreductases (Cava *et al.*, 2004),

suggests that it lacks the ability to pump protons upon NADH oxidation. Moreover, the observation that the replacement of Nqo by Nrc in cells growing aerobically (strains carrying pWURdnrT) results in a much lower growth rate, and the relatively minor effect on these growth rates of a *nrcN* mutation (Fig. 7B) supports a lower energy yield for Nrc than for Nqo per mol of NADH oxidized when oxygen is the final electron acceptor. Therefore, the energy yield seems not to be the driving force that had selected for the adaptation of DnrT to its repressor role on *nqo*, unless some kind of electron channelling between respiratory complexes exists that could limit the energy yield after the partial replacement (Nqo by Nrc) of components. In this sense, there are growing evidences of the formation of respiratory supra-complexes in bacteria (Megehee *et al.*, 2006) and yeasts (Cruciat *et al.*, 2000). Alternatively, one can imagine DnrT as a mechanism evolved by a selfish mobile element, like NCE, to ensure its integrity upon selection after horizontal transference: repression of Nqo could make the cell more energetically dependent on the presence of NCE.

Concluding remarks and perspectives

This work has shown the DnrT protein as the direct responsible for the replacement of respiratory chains that takes place during adaptation of *T. thermophilus* to nitrate respiration, showing for the first time *in vitro* and *in vivo* the direct activation and repression of thRNAPh transcription activity by a thermophilic CRP homologue. However, our data also opened several questions about how the absence of oxygen and the presence of nitrate are sensed by this organism. We have presented evidences that suggest that *T. thermophilus* uses for this purpose completely different mechanisms from that shown by *E. coli* to detect both signals. Instead of using a FNR homologue as oxygen sensor, *T. thermophilus* apparently uses DnrS, a protein containing a GAF domain, but the actual O₂-sensory cofactor remains unidentified. On the other hand, the mechanism by which nitrate affects the expression of the *dnr* and *nar* operons remains unsolved. In most bacteria, nitrate as a non-permeable solute is sensed at the periplasm by homologues of NarX, the membrane partner of a two-component regulatory system of *E. coli*, and the signal is transmitted by phosphorylation of homologues of NarL, the corresponding response regulator. However, neither the NCE nor the genomes of the sequenced strains of *T. thermophilus* encode homologues of such a nitrate-sensory transmission system. This suggests that as it apparently happens with O₂ detection, a different mechanism for nitrate detection and transcription activation has evolved in this ancient bacterial lineage. The availability of new genetic tools for this extreme ther-

mophile, described and used in this work for the first time, will help to find answers to these questions.

Experimental procedures

Strains and growth conditions

The *E. coli* strains DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] and BL21DE3 [*hsdS*, *gal* (λ clts857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7* gene 1)] were used for plasmid construction and protein expression respectively. *T. thermophilus* NAR1 is the facultative anaerobic wild-type strain in which the presence of the NCE was first described. This strain was identified as HB8 in previous works (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a), but sequence comparisons with the recently available genome of the type strain revealed that they are highly related but different strains. The derivative *nrcN::kat* mutant of this strain was also used (Cava *et al.*, 2004). *T. thermophilus* HB27 is a wild-type aerobic strain provided by Dr Koyama. *T. thermophilus* HB27c is a facultative anaerobe derived from HB27 to which the NCE was transferred by conjugation (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b).

Aerobic growth of *T. thermophilus* was routinely carried out on TB at 60°C or 70°C under mild stirring (150 r.p.m.) in one-fifth of the volume of the flask (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b). Induction by nitrate and anoxia (nitrate/anoxia conditions) was achieved by arresting the shaker and the simultaneous addition of potassium nitrate (40 mM) to aerobic cultures grown to an OD₅₅₀ of 0.3. Under these conditions, rapid consumption of O₂, along its low solubility at high temperature, makes the culture anoxic in a very short time. Completely anaerobic growth was carried out in screw-capped tubes containing 10 ml of TB and potassium nitrate (40 mM), overlaid by mineral oil (Cava *et al.*, 2004). Agar (1.5% w/v) was added to the TB medium for growth on plates. When required for selection, Kanamycin (30 mg l⁻¹), Bleomycin (15 mg l⁻¹) or Hygromycin B (100 mg l⁻¹) were added to the growth medium.

Escherichia coli was grown at 37°C on liquid or solid LB medium. Kanamycin (30 mg l⁻¹), Ampicillin (100 mg l⁻¹), Bleomycin (3 mg l⁻¹) and/or Hygromycin B (100 mg l⁻¹) were also used when needed.

DNA and RNA methods

DNA and RNA isolation, plasmid purification, restriction analysis, plasmid construction and DNA sequencing were carried out by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). PCR was performed with the DNA polymerase from *T. thermophilus* as described by the manufacturer (BIOTOOLS B & M, Madrid, Spain). For semi-quantitative RT-PCR the Ready-To-Go™ kit (Amersham Biosciences) was used. Directed mutagenesis was carried out by PCR. The primers used are described in Table S1.

Gene cloning, plasmids and transformation

The *dnrS* and *dnrT* genes were identified within the sequence of plasmid pUP1B, a pUC119 derivative from a gene library

(Fernández-Herrero *et al.*, 1997) selected by colony blot with a 3' probe of the *nar* operon. *E. coli*-*Thermus* sp. shuttle vectors pMK184 (this work), pWUR112/77-1 (Brouns *et al.*, 2005) and pMH184 (this work) are derivatives of pMK18 (de Grado *et al.*, 1999) encoding compatible thermostable resistances to Kanamycin, Bleomycin and Hygromycin B (Nakamura *et al.*, 2005) respectively. Plasmids pMHnrbgaA, pMHnrcbgaA, pMHdnrbgaA and pMHnqobgaA are derivatives of pMH184 in which the thermostable beta-galactosidase reporter gene *bgaA* (Moreno *et al.*, 2003) is expressed under the control of DNA fragments containing the promoter regions of the *nar*, *nrc*, *dnr* and *nqo* operons respectively. The sizes of the promoters included in these plasmids with respect to the translation start codon of their respective first genes are: -784 to +6 (*nar*), -249 to +3 (*dnr*), -343 to +315 (*nrc*) and -448 to +3 (*nqo*). In all the constructs, the *bgaA* gene was preceded by a Shine-Dalgarno sequence (GGAGG).

Plasmids pWURdnrT, pWURdnrTSR and pWURdnrS are derivatives of pWUR112/77-1 used for constitutive expression of the wild-type DnrT, its S185A/R186L mutant and the DnrS protein respectively. For this purpose, the respective genes were amplified by PCR (Table S1) and cloned between the NdeI and the EcoRI sites of plasmid pET22b (Novagen) to further proceed to their isolation by XbaI and EcoRI digestion and cloning in the same sites of pWUR112/77-1. In these constructs, transcription from the constitutive PslpA promoter of the Bleomycin resistance cassette continues through the cloned genes, allowing their constitutive expression.

Transformation of *T. thermophilus* with linear or circular DNA was achieved by natural competence (Cava *et al.*, 2004), whereas standard protocols were used to transform *E. coli*.

Isolation and complementation of mutants

Plasmid pK18 is a derivative of pUC18 used as integrative vector in *T. thermophilus* because of the presence of the *kat* gene (Laptenko *et al.*, 2006). Null *dnrT* mutants were isolated by recombinative insertion of a pK18 derivative (pK18 Δ NtCt-dnrT) carrying a central fragment of *dnrT* (positions +101 to +548) obtained by PCR with the primers dnrTEcoRI and dnrTBamHI (Table S1). The S185A/R186L-directed mutant was obtained by standard PCR protocols by using primers dnrTmutSR, dnrTEcoR1rev and dnrTNde1 (Table S1). The replacement of the wild-type *dnrT* gene by its derivative encoding the S185A/R186L double mutant was carried out by using a construct in which the mutant gene was cloned into pK18 from positions +101 to the final stop codon of the *dnrT* sequence to direct its integration by homologous recombination. Insertional *dnrS::kat* mutants were obtained by transformation with a linear DNA fragment carrying the *dnrS* gene interrupted by the *kat* gene at a PstI site at position +1255 with respect to its translation start, and flanked by appropriate upstream and downstream homologous regions for recombination. In this *dnrS::kat* mutant, the PslpA promoter of the *kat* gene provides constitutive transcription to *dnrT* because of the absence of a transcription terminator. In all instances, the nature of the isolated mutants was checked by PCR and by immunodetection with anti-DnrT or anti-DnrS. Complementation experiments of these mutants were carried

out by transformation with the pWUR derivatives described above.

Promoter induction assays

Quantitative measurements of the transcription of the *nar*, *nrc*, *dnr* and *nqo* operons were tested in cultures of wild-type or mutant strains of *T. thermophilus* transformed with promoter-probe plasmids pMHnarbgaA, pMHnrcbgaA, pMHdnrbgaA or pMHnqobgaA respectively. The effect of the absence or of the constitutive expression of DnrS or DnrT on these promoters was assayed on *dnrT* or *dnrS* null mutants transformed with the control pWUR plasmids or its corresponding derivatives.

For aerobic expression, cells were grown for 8 h to the exponential phase (OD_{550} between 0.3 and 0.6) under stirring (150 r.p.m.) in a 1/10 volume of the flasks to allow maximum oxygen diffusion. For anaerobic induction, aliquots of these cultures were subsequently transferred to complete the total volume of 2 ml screw-capped tubes, which were incubated for 16 more hours. Nitrate effect was assayed by providing potassium nitrate at 40 mM to the TB medium. All these experiments were performed at 60°C to limit the putative toxicity of the constitutive expression of DnrS or DnrT.

The beta-galactosidase activities of soluble cell extracts were assayed in triplicate experiments on the chromogenic substrate ONPG (ortho-nitrophenyl-galactopyranoside) at 70°C. The activities were expressed in arbitrary units as described by Miller (1992).

Sensitivity to trypsin

Cultures of the NAR1 wild-type strain bearing the pWURdnrS or pWURdnrT plasmids were grown at 70°C on nitrate-free TB medium, either under aerobic conditions (180 r.p.m.) in one-fifth volume of the flask to reach an OD_{550} of 0.5, or in static bath overnight to limit oxygen diffusion. Then cells were harvested, and subsequently disrupted by sonication (Braun Labsonic; 1 min in 0.5 s pulses, maximum power) in TS buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.5), before separation of soluble and particulate fractions by ultracentrifugation (150 000 g, 15 min at 4°C).

Sensitivity to trypsin was assayed in 80 µl of cell fraction samples containing 2 mg ml⁻¹ of protein. Then, 2 µl of trypsin solution (5 mg ml⁻¹ in HCl 1 mM) was added to the samples, which were incubated at room temperature for the indicated times. Digestion was stopped by boiling in Laemmli loading buffer, and the proteins were separated by SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989). DnrS and DnrT were identified by Western blot with specific rabbit antisera and detected by chemiluminescence with the ECL detection kit (Amersham).

Purification of DnrT, DnrS and thRNAP

The genes encoding DnrT, its S185A/R186L mutant, and DnrS, were amplified with appropriate primers (Table S1) and cloned between the NdeI and EcoRI sites of pET22b and

pET28b (Novagen) to allow their expression in *E. coli* BL21DE3, either as the native protein sequences or with N-terminal 6x-Histidine-tag fusions. Specific rabbit anti-DnrT and anti-DnrS antisera were prepared by a private company (Charles River Laboratories, Chalaronne, France) from the respective proteins purified by SDS-PAGE for their further use in immunodetection assays.

Both proteins were purified by affinity chromatography on Ni-NTA agarose (Qiagen) followed by thermal denaturation (70°C, 15 min) of remaining *E. coli* proteins. DnrT was further purified through a size-exclusion chromatography on superdex-200 and stored in aliquots at -20°C with glycerol (40%) until use. The thRNAPc was purified from *T. thermophilus* as in (Vassilyeva *et al.*, 2002). Quantitative *in vitro* transcription assays (Vassilyeva *et al.*, 2002; Laptenko and Borukhov, 2003) revealed that the thRNAPc preparation contained 80% of catalytically active molecules. Reconstituted thRNAPh (holoenzyme) was obtained by combining 0.5 mg of thRNAPc with purified 0.15 mg of recombinant SigA (σ^A) (Nishiyama *et al.*, 1999) or SigE (σ^E) factors followed by holoenzyme purification by size-exclusion chromatography using Superose 6 column (Vassilyeva *et al.*, 2002). Recombinant SigE was a generous gift from Dr Jookyung Lee.

ThRNAP recruitment

A scheme of the recruitment experiment is shown in Fig. 6A. Biotine-labelled Pnrc (positions -207 to +28, 235 bp) was bound to ImmunoPure Immobilized Streptavidin Gel (Pierce) in binding buffer (20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1 mg ml⁻¹ Bovine seroalbumin, 5 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.9). Then, the DnrT protein or its SR/AL mutant (1 µg) was incubated for 15 min at 50°C with 0.2 µg of Pnrc-resine in 20 µl samples containing 2 µg of salmon sperm DNA. ThRNAPc or thRNAPh (4.7 pmol) was then added and incubated for 15 more minutes at the same temperature. After three washing steps with 300 µl of binding buffer, the bound proteins were eluted with 1% SDS, separated in a 4–20% NuPAGE Bis-Tris gradient gel (Invitrogen), and Coomassie blue stained. Samples without DnrT were used as negative controls.

In vitro transcription

In vitro transcription was carried out in 10 µl samples of transcription buffer (50 mM MOPS, 40 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM Dithiothreitol, pH. 6.5) containing 0.3 pmol of the promoter DNA (Pnar, PT7A1, Pnrc or Pnqo), 1.75 pmol of thRNAPh, bearing either σ^A or σ^E , and the specified amounts of wild-type DnrT or its SR/AL mutant. Transcription started at 60°C by adding a NTP mix (0.8 mM GTP, 0.8 mM ATP, 0.1 mM CTP, 0.2 mM UTP and [α -³²P]-CTP) and continued for different times before analysis. The sizes for the promoter regions amplified by PCR (Table S1) used in these assays were: -207 to +28 for Pnrc (235 bp), -784 to +6 (790 bp) and -211 to +1 (212 bp) for Pnar, and -448 to +3 for Pnqo (458 bp). The 270 bp T7A1 promoter was used as positive transcription control in different experiments (Nudler *et al.*, 1997).

Amino acid sequence alignment and molecular modeling of DnrT

The domain identification on DnrS and DnrT was carried out through the InterPro Scan Sequence search program at the EMBL-EBI. DnrT homologues obtained with BLAST (Altschul *et al.*, 1995) were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) and T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000) algorithms. The structural model of DnrT was built on CRP–DNA complex structure (PDB entry 1O3R; Chen *et al.*, 2001) by using the SWISS-MODEL server facilities (Schwede *et al.*, 2003) and its quality examined with WHAT-CHECK procedure (Hooft *et al.*, 1996) of the WHAT IF program (Vriend, 1990). The model was further refined by subjecting it to three steps of 50 cycles of the steepest descent minimization method of the DEEVIEW program (Guex and Peitsch, 1997). The model for interaction of thRNAP α -C-terminal domain with AR2 of DnrT was built using the protein–protein rigid docking method implemented in HEX program (Ritchie and Kemp, 2000), setting the initial position of the putative complex on the CRP- α -ecRNAP C-domain structure (PDB entry 1LB2; Benoff *et al.*, 2002). The model for DnrT–sigma A interaction was carried out by the same method using the deduced DnrT model structure and the co-ordinates of thRNAPh structure, which includes the position of σ^A in the complex (PDB 1SMY; Artsimovitch *et al.*, 2004). To reduce the translational-rotational search, the initial positioning of the putative complex was set by an initial generation of 5×10^3 different docking solutions for the complex, using the low-resolution docking algorithm GRAMM (Vakser, 1995), and by selecting solution that minimizes the average distance between the DnrT AR3 site and its binding site on σ^A , as described (D'Autreaux *et al.*, 2005).

Data deposition

The sequence of the *dnr* operon was deposited to EMBL GenBank with the identification No. AM161043.

Acknowledgements

This work has been supported by grants of code BIO2004-02671 co-funded by the 'Ministerio de Educación y Ciencia' and the European Union to J. Berenguer, SAF2004-06843 to P. Gómez-Puertas, and NIH Grant GM54098 to S. Borukhov. Financial support of 'Fundación Ramón Areces' to CBMSO is also acknowledged. We want to thank Dr Stan Brouns for providing the pWUR112/77-1 plasmid, and to Dr Nakamura for giving us the thermostable resistance to Hygromycin used to construct pMH184.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1995) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**: 458–459.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., *et al.* (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**: 299–310.
- Benoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., *et al.* (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP- α CTD–DNA complex. *Science* **297**: 1562–1566.
- Brouns, S.J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A.P., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2005) Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* **280**: 11422–11431.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199–213.
- Cava, F., and Berenguer, J. (2006) Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Biochem Soc Trans* **34**: 97–100.
- Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F., and Berenguer, J. (2004) A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **279**: 45369–45378.
- Chen, S., Vojtechovsky, J., Parkinson, G.N., Ebright, R.H., and Berman, H.M. (2001) Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP–DNA complex: DNA binding specificity based on energetics of DNA kinking. *J Mol Biol* **314**: 63–74.
- Crack, J., Green, J., and Thomson, A.J. (2004) Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* **279**: 9278–9286.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2000) The cytochrome *bc1* and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **275**: 18093–18098.
- D'Autreaux, B., Tucker, N.P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005) A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**: 769–772.
- Fernández-Herrero, L.A., Olabarria, G., and Berenguer, J. (1997) Surface proteins and a novel transcription factor regulate the expression of the S-layer gene in *Thermus thermophilus* HB8. *Mol Microbiol* **24**: 61–72.
- Galperin, M.Y. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552–567.
- de Grado, M., Castan, P., and Berenguer, J. (1999) A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **42**: 241–245.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714–2723.
- Hartmann, R.K., Wolters, B., Kroger, B., Shultze, S., Spetch, T., and Erdmann, V.A. (1989) Does *Thermus* represent another deep eubacterial branching? *Syst Appl Microbiol* **11**: 243–249.
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E.E. (1996) Errors in protein structures. *Nature* **381**: 272.
- Korner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp–Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling

- alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559–592.
- Laptenko, O., and Borukhov, S. (2003) Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus*. *Methods Enzymol* **371**: 219–232.
- Laptenko, O., Kim, S.S., Lee, J., Starodubtseva, M., Cava, F., Berenguer, J., *et al.* (2006) pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *EMBO J* **25**: 2131–2141.
- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., and Ebricht, R.H. (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 10–20.
- Megehee, J.A., Hosler, J.P., and Lundrigan, M.D. (2006) Evidence for a cytochrome *bcc-aa3* interaction in the respiratory chain of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **152**: 823–829.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., and Berenguer, J. (2003) Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plasmid* **49**: 2–8.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H., and Hoshino, T. (2005) In vivo directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng* **100**: 158–163.
- Nishiyama, M., Kobashi, N., Tanaka, K., Takahashi, H., and Tanokura, M. (1999) Cloning and characterization in *Escherichia coli* of the gene encoding the principal sigma factor of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **172**: 179–186.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205–217.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., and Goldfarb, A. (1997) The RNA–DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* **89**: 33–41.
- Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 355–376.
- Rainey, F.A., and da Costa, M.S. (2001) The genus *Thermus*. In *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Garrity, G.M., Boone, D.R., and Catenholz, R.W. (eds). New York: Springer, pp. 393–404.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., and Berenguer, J. (1998a) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim Biophys Acta* **1396**: 215–227.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., Marin, I., and Berenguer, J. (1998b) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J Bacteriol* **180**: 3137–3143.
- Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S., and Taylor, C.J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 165–178.
- Ritchie, D.W., and Kemp, G.J. (2000) Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins* **39**: 178–194.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardiwal, S., Kendall, S.L., Movahedzadeh, F., Rison, S.C., Stoker, N.G., and Djordjevic, S. (2005) A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible *Mycobacterium tuberculosis* DosS protein binds haem. *J Mol Biol* **353**: 929–936.
- Schroder, I., Darie, S., and Gunsalus, R.P. (1993) Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJ*) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. *J Biol Chem* **268**: 771–774.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381–3385.
- Stewart, V. (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **9**: 425–434.
- Stewart, V. (2003) Biochemical society special lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem Soc Trans* **31**: 1–10.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Uندن, G., and Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 217–234.
- Vakser, I.A. (1995) Protein docking for low-resolution structures. *Protein Eng* **8**: 371–273.
- Vassilyeva, M.N., Lee, J., Sekine, S.I., Laptenko, O., Kuramitsu, S., Shibata, T., *et al.* (2002) Purification, crystallization and initial crystallographic analysis of RNA polymerase holoenzyme from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1497–1500.
- Vollack, K.U., Hartig, E., Korner, H., and Zumft, W.G. (1999) Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. *Mol Microbiol* **31**: 1681–1694.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**: 52–56.
- Wood, N.J., Alizadeh, T., Bennett, S., Pearce, J., Ferguson, S.J., Richardson, D.J., and Moir, J.W. (2001) Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR. *J Bacteriol* **183**: 3606–3613.
- Yeats, C., Bentley, S., and Bateman, A. (2003) New knowledge from old: *in silico* discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol* **3**: 3.
- Zafra, O., Cava, F., Blasco, F., Magalon, A., and Berenguer, J. (2005) Membrane-associated maturation of the heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **187**: 3990–3996.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533–616.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. DnrT amino acid sequence alignment. Sequences of DnrT and other members of the CRP family were compared and aligned using CLUSTALW program. Identical residues are shaded in grey, and residues subjected to site-directed mutagenesis in DnrT are marked with asterisks. Secondary structure elements (H, alpha helix; E, beta strand) of *E. coli* CRP (CRP-Eco, PDB entry 1O3R), as well as two structural motifs, the dimerization helix and the helix-turn-helix DNA-binding motif are shown in the lower row (CRP-Eco (ss)). Known sites of CRP interaction with RNAP (activation regions AR1, AR2 and AR3) are shown as coloured boxes above the DnrT sequence. Schematic diagram showing the spatial relationship of AR1-AR3 regions of CRP and RNAP subunits is presented at the bottom. Protein accession numbers: THET2-TtheH – TTC1072 from *T. thermophilus* HB27; FLP-Llac – Q9S393 from *Lactococcus lactis*; NarR-Ppan – Q93PW2 from *Paracoccus pantotrophus*; DnrE-Pst – Q9X7J7, DnrD-Pst – Q9X7J4, and FnrA-Pst – P7200 from *Pseudomonas stutzerii*; Dnr-Pae – Q51441 and ANR-Pae – P23926 from *P. aeruginosa*; FNR-Eco – P0A9E6 and CRP-Eco – P0ACJ8 and from *E. coli*.

Fig. S2. A) Immuno-detection of the indicated amounts (ng) of DnrS and DnrT purified from over-expressing strains of *E. coli*. B) Western blot of total protein extracts from *T. thermophilus* showing the DnrS and DnrT proteins expressed in the facultative wild type strain (NAR1) grown aerobically (A) or treated for 4 hours under anoxia with nitrate (An), and in its *dnrS::kat* mutant grown aerobically before (–) or after transformation with pWUR (pW) or with pWURdnrS (pWdnrS). The aerobic strain HB27 (27) is shown as control. Note that constitutive expression of DnrT in the *dnrS::kat* mutant during aerobic growth is independent of the presence of pWURdnrS.

Fig. S3. DNase I footprinting analysis on triplicate samples of the Pnrc promoter with (+DnrT) or without (-DnrT) the DnrT protein. Samples (20 µl) of Pnrc (7 pmol), labelled in the template strand by PCR with primers [³²P]-FPpncRev and FPpnc47rev, were incubated for 5 min at 50°C with DnrT (5,

10, 50 pmol) in the presence of 2 µg of [dl-dC], and digested with DNase I for 1 min at 50°C in reaction buffer (8 mM HEPES, 6 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, pH 7.5). Samples were analyzed by denaturing PAGE and visualized by autoradiography. The sequence protected by DnrT is shown.

Fig. S4. Structural model for DnrT. A) Ribbon plot of the proposed structure for DnrT dimer interacting to a DNA molecule, represented as a surface coloured according to electrostatic properties. Atoms of residues located in the interaction areas AR1 (yellow), AR2 (blue) and AR3 (green) are depicted as spheres. Model shows the location of the large dimerization helices of both molecules in the dimer interface, as well as the HTH motif in close contact to the major groove of DNA. The location of the cAMP molecules in the CRP structure is shown for clarity. B) Detail of modeled AR3-σ^A – DNA interaction. Position of residues in AR3 domain, represented as 'sticks', indicates the location of side chains of R63 and K64 (blue) pointing to the negatively charged surface of DNA phosphate backbone. Acidic chains of D59 and E61 (red) are faced to the positive residues of K403, R406, and K407 of σ^A. Residues R396, and R398 appear to bind phosphate groups in the backbone of DnrT-bound DNA. C) Modelled interaction of DnrT to thRNAP. Proteins, as well as DNA bound to DnrT, are represented as atomic surfaces. AR2 site in DnrT and its proposed recognition site in α-thRNAP have been highlighted. D) Model for the interaction of the C-terminal domain of the α-thRNAP (green ribbon) with DnrT through the AR1 domain. Atoms of residues in contact in both proteins are illustrated as spheres. DNA surface has been omitted for clarity. Plots were generated using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA).

Table S1. Oligonucleotides used in this work and their purpose.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

An activity-independent selection system of thermostable protein variants

Hélène Chautard¹, Emilio Blas-Galindo², Thierry Menguy¹, Laure Grand'Moursel¹, Felipe Cava², José Berenguer² & Marc Delcourt¹

We describe an activity-independent method for the selection of thermostable mutants of any protein. It is based on a fusion construct comprising the protein of interest and a thermostable antibiotic resistance reporter, in such a way that thermostable mutants provide increased resistance in a thermophile. We isolated thermostable mutants of three human interferons and of two enzymes to demonstrate the applicability of the system.

Predictions of which changes are to be made in a specific protein to increase its thermostability is a difficult task even when the three-dimensional structure is known¹. Directed evolution methods have been developed and are a useful tool for this goal. These strategies, however, require a high-throughput robotic format, and costs and time usually limit the application of these methods to small-sized libraries (typically 10³–10⁵ variants), thus restricting the sequence space to be explored. In this context, the use of direct selection methods to increase thermostability is a desirable, but still a rare as well as a technically difficult, accomplishment^{2–4}. Here we describe an activity-independent system that bypasses the above limitations.

This new method, named THR, is based on the expression of fusions between the protein of interest (N terminus) and a thermostable variant of kanamycin nucleotidyl transferase⁵ (C terminus) in *Thermus thermophilus*. As an improperly folded N terminus of a protein has a deleterious effect on the folding of its C-terminal portion (the reporter)^{6,7}, we anticipated that the stability of mutants of the protein of interest would be transduced to the fused reporter and lead to a life-or-death signal at high temperatures.

To validate this hypothesis, we constructed the pNCK *Escherichia coli*–*Thermus* spp. shuttle plasmid (Fig. 1a and Supplementary Methods online), which provides the thermophile with high kanamycin resistance (>60 mg/l) at 70 °C as the result of *kat^{tv}* expression (Fig. 1a). Then, we cloned a fragment of the human

interferon gamma (IFN γ) gene (*IFNG*) encoding the 145-aa mature form of the protein in frame with the antibiotic reporter (pNCK-IFN γ ; Fig. 1a) and a variant of the *IFNG* with a Stop codon close to the end of the gene (pNCK-IFN γ stop) as a fusion-failed control. We also generated constructs with two thermostable IFN γ mutants: pNCK-IFN γ Δ 10, which lacks the 10 terminal residues⁸, and pNCK-IFN γ ::E30C,S92C, which contains an additional disulfide bridge⁹.

We transformed these constructs in *T. thermophilus*, dot-plotted them on plates containing different concentrations of kanamycin, and incubated the plates at 60 or 70 °C. The presence of wild-type IFN γ did dramatically limit the growth at 70 °C on plates containing 20 μ g/ml of kanamycin; we detected no growth under more stringent conditions (>40 μ g/ml of kanamycin; Fig. 1b). The Stop-mutant construct had even more limited growth as it does not allow expression of the reporter. By contrast, fusions with both of the thermostable mutants had increased growth as compared to the wild type. Overall, these first model experiments validated our approach by clearly linking thermostability of the target and bacterial growth.

As an increase from 60 to 70 °C produced a decrease in the growth capability provided by the respective plasmids (data not shown), we concluded that the antibiotic concentration and the incubation temperature could be managed as independent

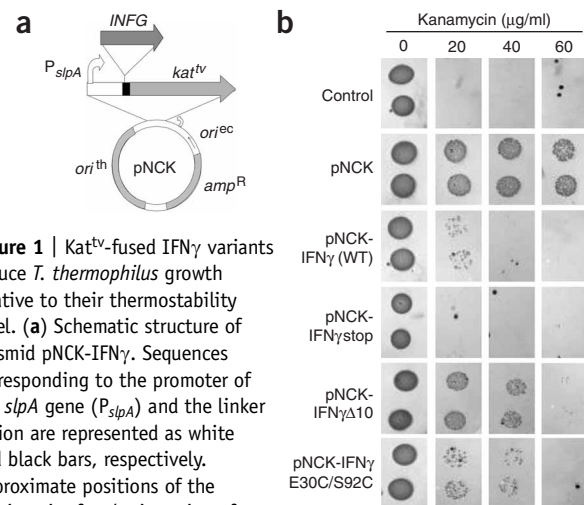


Figure 1 | *Kat^{tv}*-fused IFN γ variants induce *T. thermophilus* growth relative to their thermostability level. **(a)** Schematic structure of plasmid pNCK-IFN γ . Sequences corresponding to the promoter of the *slpA* gene (*P_{slpA}*) and the linker region are represented as white and black bars, respectively. Approximate positions of the cloning site for the insertion of target genes, the *Thermus* spp. origin of replication (*orith*), *E. coli* origin of replication (*ori^{ec}*) and the ampicillin resistance gene (*amp^r*) are indicated. **(b)** Growth at 70 °C in the presence of the indicated concentrations of kanamycin of untransformed *T. thermophilus* cells (control) or of cells transformed either with plasmid pNCK or with its derivatives as indicated. WT, wild-type.

¹Biométhodes SA, Genavenir 8, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry, France. ²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid 28049 Madrid, Spain. Correspondence should be addressed to J.B. (jberenguer@cbm.uam.es) or M.D. (marc.delcourt@biomethodes.com).

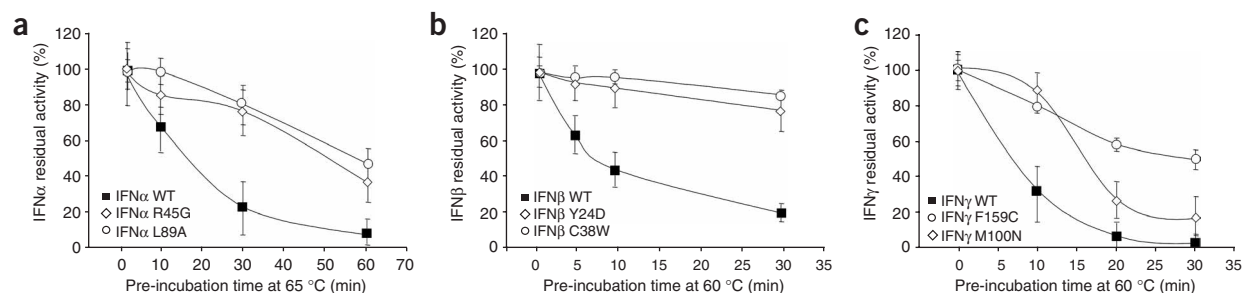


Figure 2 | Thermoresistance kinetics of two thermostable mutants of IFN α , IFN β and IFN γ . (**a–c**) Thermoresistance assays of two selected mutants of each interferon respectively, at the indicated temperatures. Residual activity is expressed as a percentage of the activity before incubation. Error bars, s.d. values from three independent experiments. All mutants had no more than 10% difference in specific activity when compared to their wild-type counterpart. WT, wild-type.

parameters to choose the best selection stringency for each specific protein target.

Our next objective was to validate the system to select new thermostable variants. We generated a library from pNCK-IFN γ in *E. coli* using the Massive Mutagenesis technology^{10,11}. A complete diversity was introduced at each amino acid position in a combinatorial manner. The library had a diversity of 5×10^6 independent mutant clones and an average of 1.0 mutations per molecule. Based on our experience, we estimated that the library contained about one-third wild-type clones, one-third single mutants, one-sixth double mutants and one-sixth clones containing three or more mutations.

From the data we obtained (Fig. 1) we chose 70 °C and 20 μ g/ml kanamycin as selective conditions in *T. thermophilus*. This primary selection resulted in 230 bacterial colonies. We collected these colonies, pooled them, extracted plasmids from them and transformed the plasmids into *E. coli* cells. Then we subjected about 120 *E. coli* clones to profile analysis. Fewer than 10% had a detectable alteration, supporting the existence of only a minor recombination background, not substantially affecting the overall selection procedure. Sequencing of 96 individual clones showing normal migration profiles revealed that 10% of clones contained a Stop codon or a 1–2 bp deletion (always close to the 5' terminus), similar to the background reported for other systems¹². We also selected and discarded residual wild-type clones and redundant mutants. Finally, we re-assayed 33 mutants in *T. thermophilus* (secondary selection) and measured the ratio between the number of colonies growing on selective (20 μ g/ml kanamycin, 70 °C) versus non-selective (10 μ g/ml kanamycin, 60 °C) conditions. Here we refer to this ratio as the 'thermostability factor', and it indicates the capability of the mutant to fold at high temperature. Twenty-six clones had a greater thermostability factor value than the parental protein (Supplementary Table 1 online).

We applied the same procedure to libraries of interferon alpha (IFN α) and interferon beta (IFN β) coding genes cloned in pNCK. For the primary selection on the respective libraries we chose the following conditions: 60 °C and 80 μ g/ml kanamycin for IFN α and 60 °C and 20 μ g/ml kanamycin for IFN β . Out of the 96 clones initially selected, 33 (containing 93 amino acid substitutions in total) and 29 (containing 49 amino acid substitutions in total) passed the second screening step for IFN α and IFN β , respectively (re-validation in *T. thermophilus*; Supplementary Table 2 online).

As the selection procedure is activity-independent, it was necessary to detect which of the mutant proteins still retained the biological activity in a third selection step. We introduced each amino acid substitution separately in the respective IFN α , IFN β and IFN γ coding genes, expressed the proteins in COS-7 cells and used them in a biological assay (Supplementary Methods). Approximately 15% of the mutants were either inactive or not secreted. We assayed the thermoresistance of the mutants that retained at least 50% of the wild-type activity. Analysis of two example mutants for each protein is shown in Figure 2. From IFN α , IFN β and IFN γ mutants that conserved the activity, in this screen we confirmed 21, 18 and 7 mutations, respectively (Supplementary Table 2).

To determine whether the observed thermoresistance was due to an increase in thermostability and not a consequence of a better refolding from a thermally induced unfolded state, we carried out a pulse-proteolysis assay¹³ on the IFN γ mutants F159C and M100N as complementary stability assay. The mutants were more resistant to protease digestion in the presence of urea (Supplementary Fig. 1 online). This result, together with their thermostability factor values (which quantifies folding at 70 °C), clearly support the idea that the THR system selects mutants with increased thermostability and not just variants having a higher refolding capability. Notably, THR can also function with proteins containing disulfide bridges (that is, IFN α and IFN β and mutant IFN γ :E30C/S92C), thus showing that their formation seems to occur correctly in *T. thermophilus* cytoplasm (as was described recently¹⁴).

The above experiments with IFN mutants, however, were not informative regarding a possible increase in thermoactivity. To assess this, we repeated the THR selection with two enzymes: a lipase (LipA; 20 kDa) and the two-domain formate dehydrogenase (Fdh; 45 kDa), whose coding genes were cloned into pNCK (Supplementary Methods). We carried out the selection at 70 °C on 80 μ g/ml kanamycin (LipA) or 150 μ g/ml kanamycin (Fdh) plates, on 10^7 -variant libraries obtained using Massive Mutagenesis. We combined five LipA mutations selected by THR in a single enzyme (LipA5x) and compared its thermoresistance and thermoactivity to that of the parental enzyme. The LipA5x mutant was dramatically more thermoactive than its parent, LipA. Whereas the LipA5x mutant was as active at 55 °C as it was at 35 °C, the activity of LipA at 55 °C was 20% of its activity at 35 °C (Supplementary Fig. 2 online). In contrast,

THR-selection on the Fdh library allowed the isolation of single mutants more active at 60 °C than the parental protein (an example is shown in **Supplementary Fig. 3** online). These results confirm that the THR can be also used to isolate mutants with increased thermoactivity.

Notably, THR selection can be applied to larger proteins compared to selection of thermostable proteins using Proside, in which there are limitations to the size of the target sequence to select¹⁵. Other systems for selection of thermostable mutants like yeast display² can be also applied to large proteins, but require tools for flow cytometry-based massive selection (that is, antibodies), which are expensive and not always available for every protein.

Overall, these data support that the THR technology allows a dramatic increase in the range of proteins susceptible to stabilization, requires no *a priori* knowledge of the protein structure, maximizes the probability of success when looking for thermostable variants and bypasses the need of fastidious high-throughput screening. As paradigmatic example of this assumption, here we identified several thermostabilizing mutations (C21W, F159C, R162E, R163T) that are found outside of the resolved part of the IFN γ crystalline structure and could not have been predicted by rational protein design.

Note: Supplementary information is available on the Nature Methods website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Blésa, J. Sylvestre, B. Winter and J.-C. Barale for useful discussions and comments on the manuscript and M.-A. Carriço, E. Matthieu and S. Jovelín for their technical help. We acknowledge financial support of projects BIO2004-02671 from Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), S0505/PPQ/0344 from Comunidad Autónoma de Madrid to José Berenguer and an institutional grant from Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. E.B.-G. was supported by a fellowship from the MEC.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.C. contributed to design of libraries and construction and selection procedures. E.B.-G. and F.C. contributed to pNCK construction and initial settings and validation of the selection procedures in *T. thermophilus*. T.M. and L.G.'M. contributed to interferon and enzyme assays. M.D. and J.B. contributed to THR design and determining experimental settings.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Published online at <http://www.nature.com/naturemethods/>
Reprints and permissions information is available online at
<http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

1. Eijsink, V.G., Gaseidnes, S., Borchert, T.V. & van den Burg, B. *Biomol. Eng.* **22**, 21–30 (2005).
2. Shusta, E.V., Kieke, M.C., Parke, E., Kranz, D.M. & Wittrup, K.D. *J. Mol. Biol.* **292**, 949–956 (1999).
3. Shusta, E.V., Holler, P.D., Kieke, M.C., Kranz, D.M. & Wittrup, K.D. *Nat. Biotechnol.* **18**, 754–759 (2000).
4. Bommarius, A.S., Broering, J.M., Chaparro-Riggers, J.F. & Polizzi, K.M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 606–610 (2006).
5. Matsumura, M. & Aiba, S. *J. Biol. Chem.* **260**, 15298–15303 (1985).
6. Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. & Terwilliger, T.C. *Nat. Biotechnol.* **17**, 691–695 (1999).
7. Maxwell, K.L., Mittermaier, A.K., Forman-Kay, J.D. & Davidson, A.R. *Protein Sci.* **8**, 1908–1911 (1999).
8. Slodowski, O., Bohm, J., Schone, B. & Otto, B. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1133–1140 (1991).
9. Waschutz, G. *et al. Protein Eng.* **9**, 905–912 (1996).
10. Saboulard, D. *et al. Biotechniques* **39**, 363–368 (2005).
11. Delcourt, M. & Blesa, S. Method for massive mutagenesis. European patent 1311670 B1 and US patent 7202086 B2 (2001).
12. Cabantous, S. *et al. J. Struct. Funct. Genomics* **6**, 113–119 (2005).
13. Park, C. & Marqusee, S. *Nat. Methods* **2**, 207–212 (2005).
14. Beeby, M. *et al. PLoS Biol.* **3**, e309 (2005).
15. Sieber, V., Pluckthun, A. & Schmid, F.X. *Nat. Biotechnol.* **16**, 955–960 (1998).